

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Medicina y Cirugía Animal



**ENFERMEDADES VECTORIALES EN GATOS DE
LA COMUNIDAD DE MADRID: ESTUDIO
SEROLÓGICO, MOLECULAR Y
EPIDEMIOLÓGICO DE LA INFECCIÓN POR
“EHRlichia spp, ANAPlasma spp,
NEORICKETTSIA spp, LEISHMANIA spp Y
BARTONELLA spp”.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Tania Ayllón Santiago

Bajo la dirección del doctor

Ángel Sainz Rodríguez

Madrid, 2010

- **ISBN: 978-84-693-0658-1**



Universidad Complutense de Madrid

FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL

ENFERMEDADES VECTORIALES EN
GATOS DE LA COMUNIDAD DE MADRID:
ESTUDIO SEROLÓGICO, MOLECULAR Y
EPIDEMIOLOGICO DE LA INFECCIÓN POR
Ehrlichia spp., *Anaplasma* spp., *Neorickettsia* spp.,
Leishmania spp. Y *Bartonella* spp.

T E S I S D O C T O R A L

TANIA AYLLÓN SANTIAGO

Madrid, 2009



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL

**ENFERMEDADES VECTORIALES EN GATOS DE
LA COMUNIDAD DE MADRID: ESTUDIO
SEROLÓGICO, MOLECULAR Y EPIDEMIOLÓGICO
DE LA INFECCIÓN POR *Ehrlichia* spp., *Anaplasma*
spp., *Neorickettsia* spp., *Leishmania* spp. Y
Bartonella spp.**

TESIS DOCTORAL

TANIA AYLLÓN SANTIAGO

Madrid, 2009

D. Ángel Sainz Rodríguez, con D. N. I. 2225544-H, Profesor Titular de Patología Médica y de la Nutrición del Departamento de Medicina y Cirugía Animal, en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “Enfermedades vectoriales en gatos de la Comunidad de Madrid: Estudio serológico, molecular y epidemiológico de la infección por *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Neorickettsia* spp., *Leishmania* spp. y *Bartonella* spp.” ha sido realizada bajo su dirección y supervisión por D^a. Tania Ayllón Santiago.

Revisado el presente trabajo, considera que tiene la debida calidad para su presentación y defensa.

Madrid, 20 de Febrero de 2009



Ángel Sainz Rodríguez

*A mi familia, mis amigos,
y todos aquellos que han hecho posible
la realización de este trabajo*

AGRADECIMIENTOS

Los que me conocen saben que no soy parca en palabras y, sin embargo, después de haber escrito una tesis, cuando llega este momento no sé cómo expresar tanto agradecimiento a tantas personas que me han ayudado. Creo que debo unos cuantos jamones de pata negra...

Por poner algún orden, voy a empezar por la vida laboral, para acabar con la personal.

Comienzo con el equipo de trabajo, y en primer lugar, tengo que agradecerte, Ángel, la oportunidad que me has dado para realizar este trabajo. Gracias por la motivación y empeño en que aprendamos, por tus consejos y todo tu apoyo incondicional en el trabajo y la vida personal, por toda tu ayuda y lo que me has enseñado, y por tu paciencia, sobre todo en los últimos meses. No habría podido imaginar un director de tesis mejor. De todo corazón, gracias.

Gracias, Fernando, que también te ha tocado sufrir mis agobios, gracias por todos tus consejos, tu apoyo personal y profesional, y todos los buenos momentos.

Gracias, Miki por todo tu apoyo y ayuda en diferentes campos, sobre todo en las IFIs, por echarme una mano en el aprendizaje de leer las mismas. Gracias, Miguel, por tus consejos y toda tu ayuda, en especial en tu fuerte, la estadística. Gracias a cada uno por la ayuda y apoyo que me habéis dado, lo que me habéis enseñado y por todos los consejos que me han sido tan útiles.

Gracias, Enara, mi gran maestra en los cultivos celulares y por esos comienzos en la biología molecular que tanto me han ayudado, gracias por echarme una mano siempre que lo he necesitado y por todos los buenos momentos en el laboratorio.

Gracias a mis compañeras y grandes amigas, Merche, Alejandra y Carol, con las que he compartido espacio, vida e innumerables buenos momentos durante estos cuatro

años. Merche, no se cómo agradecerte todos los consejos que me has dado y la grandísima ayuda informática, menos mal que eres más paciente que yo, que si no, no sé la de veces que hubiera tirado el ordenador por la ventana. Alejandra, mi compañera de ehrlichias, cuando echo la vista atrás y veo esas millones de PCRs conjuntas que hemos hecho (a contrarreloj en algunos casos), sin contar con los infinitos frascos de cultivos celulares que hemos cuidado codo con codo, los quebraderos de cabeza y todas las historias que nos han pasado y lo bien que lo hemos sabido llevar...no puedo evitar sonreír, muchísimas gracias por toda tu ayuda. Carol, me río solo de pensar en el día en que me presentaste al famoso programita del EndNote con toda tu buena intención, yo creo que no habrá nadie sobre la faz de la tierra al que le haya dado tantos problemas el programa, muchas gracias por ser tan paciente y por ayudarme en tantas cosas. Habéis sido un gran apoyo estos años, en todos los sentidos, siempre me habéis dado muy buenos consejos, tanto en lo profesional como en lo personal, y me habéis hecho pasar muy buenos momentos, muchas gracias a todas.

Tino, mil gracias por toda tu ayuda con las innumerables IFIs que parecían interminables. Sin tu ayuda este trabajo no hubiera sido posible.

Tengo que dar también las gracias a los compañeros del laboratorio de Biopatología, en especial a Pilar; a Coro, por tu ayuda para recoger las sangres de los, a veces no tan buenos, gatitos; a Carmen, Gloria, Ernesto, M^a Luz, Susana, del laboratorio de Microbiología y Parasitología, por ser tan agradables y ayudarnos con los cultivos y problemas varios; a todo el equipo de Anestesia y Cirugía, por permitirme entrar en las cirugías para recoger muestras; a Javier Benito, por toda tu ayuda con la toma de muestras de sangre de los gatos; al equipo de Anatomía Patológica, que me habéis echado un cable cuando lo he necesitado y me habéis permitido usar el microscopio para las fotos; a Mónica, mi predecesora en la lectura de tesis, por tu ayuda informática y de papeleos y por los ánimos mutuos que tanto me han ayudado; gracias a M^a José y Laura, por la ayuda en las gestiones de la tesis y en los pequeños detalles de la misma; en general, gracias al Departamento de Medicina y Cirugía Animal y a todo el equipo del Hospital Clínico Veterinario Complutense.

Cómo no, gracias a mis amigos de Visavet, a los que he martirizado alguna que otra comida con esas fastidiosas PCRs. Gracias Nere, por toda tu ayuda en muchos temas,

por dejar tu trabajo para ayudarme, por apoyarme en todo momento y por ser como eres. Marta, mil gracias por echarme una mano con esos geles y estar disponible cuando lo he necesitado. Sergio, muchas gracias por tu apoyo informático y tu ayuda con los geles; Julio, muchas gracias por echarme una mano con los árboles filogenéticos y con el maravilloso mundo de la interpretación de los resultados moleculares; Joaquín, gracias por abrirme las puertas de vuestro laboratorio para todo lo que he necesitado; mis compañeros de promoción y amigos Maguis, JL, Rut, así como Javi, Laura, María, Pilar, Jose, Sonia, Gema, Irene, Bea, Vero, Lucía, Leydis, Elisa, Ester, Fátima, etc, etc (seguro que me dejo a alguien), gracias a todos por hacerme pasar tan buenos momentos, por vuestro humor, por tratarme como uno más de Visavet y por estar siempre dispuestos a echarme una mano cuando lo he necesitado.

Gracias a Dani, Patricia, Isra, Mario, Gus, así como a Ángel, Jesulín, Marisa, Antonio, Inés, por toda vuestra ayuda en la recogida de muestras. Gracias a todo el personal de la Clínica Veterinaria Gattos (Madrid), la Clínica Veterinaria Timanfaya (Madrid), la Clínica Veterinaria ITECA (Alcobendas), que colabora con las protectoras Amnistía Animal y Asociación Nacional Amigos de los Animales (ANAA), la Clínica Veterinaria Puerta del Ángel, la Sociedad Protectora de Animales y Plantas (SPAP), el Centro Integral de Acogida de Animales de la Comunidad de Madrid (CIAAM) y la Asociación para la Liberación y Bienestar Animal (ALBA), ya que todos ellos han colaborado con este trabajo.

Gracias a Miriam Crespo por tu ayuda también con el EndNote, a M^a Paz, por tus ánimos y a las más recientemente llegadas Violeta y Susana, por vuestros consejos.

Gracias, Elena, por tu apoyo y ayuda en la impresión de la tesis.

Quiero también agradecer en estas líneas, por el momento en el que nos encontramos, a Miriam el empujoncito que me ayudó a decidirme por esta bonita profesión, gracias de corazón.

Gracias a J. Pablo, Isabel, M^a Gel, por todos los buenos momentos y vuestros consejos.

Gracias al Departamento de Apoyo a la investigación del Área de Informática y Comunicaciones de la UCM, y en especial a Santiago Cano, por su paciencia y toda su ayuda en el manejo estadístico de los datos.

Gracias al equipo del “Intracellular Pathogen Research Laboratory” de Raleigh, Carolina del Norte, en especial al Dr. Edward Breitschwerdt, por darme la oportunidad de aprender en su tan prestigioso laboratorio de enfermedades infecciosas, así como a Ricardo Maggi, M^a Belén Cadenas, Pedro Diniz, Julie Bradley, Bárbara Hegarty y todo el equipo con el que he trabajado en Raleigh, incluidos mis compañeros y amigos, no sólo de trabajo, sino de vida en esa ciudad; gracias a todos por toda la ayuda, por todo lo que he aprendido de biología molecular y los buenos momentos pasados allí.

Gracias a los propietarios de los gatos que han formado parte de este estudio, por vuestra colaboración en el mismo.

Gracias a todos mis amigos, por vuestro apoyo y por ayudarme a hacer que la vida sea siempre más divertida.

Gracias, Mattia, por estar ahí y, sobre todo, por tu paciencia.

Y, por último, y no por ello menos importante, gracias a mis padres y mis hermanos, por darme la oportunidad de estudiar aquello que siempre me ha gustado, por estar a mi lado y por todo lo que me habéis dado en la vida y en especial por vuestra paciencia con la hija y hermana más atacada que habéis tenido. Gracias a todos mis tíos, primos y familia, por vuestro apoyo y ayuda, en especial a mi informatizado primo, que me ha ayudado con la portada.

Espero no haberme dejado a nadie, puesto, que como he dicho al inicio de estas líneas, son muchos los que me han ayudado con el presente trabajo, por tanto, gracias a todos aquellos que han puesto su granito de arena para que esta tesis pudiera realizarse.

De corazón, gracias.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1	EHRlichiosis, ANAPlasmosis y NEORICKETtsiosis	7
2.1.1	Introducción	7
2.1.2	Especies del género <i>Ehrlichia</i> , <i>Anaplasma</i> y <i>Neorickettsia</i> que afectan a cánidos	9
2.1.2.1	<i>Ehrlichia canis</i>	10
2.1.2.1.1	Cuadro clínico	12
2.1.2.1.2	Hallazgos laboratoriales	16
2.1.2.2	<i>Anaplasma platys</i>	18
2.1.2.3	<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	20
2.1.2.4	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	21
2.1.2.5	<i>Ehrlichia ewingii</i>	22
2.1.2.6	<i>Neorickettsia risticii</i>	23
2.1.3	Especies del género <i>Ehrlichia</i> , <i>Anaplasma</i> y <i>Neorickettsia</i> que afectan al hombre	25
2.1.3.1	Situación en Estados Unidos de las ehrlichiosis/anaplasmosis humanas	26
2.1.3.2	Situación en Europa de las ehrlichiosis/anaplasmosis humanas	28
2.1.3.3	Signos clínicos de las ehrlichiosis en el hombre	29
2.1.4	Diagnóstico de las ehrlichiosis y anaplasmosis	30
2.1.4.1	Diagnóstico directo	30
2.1.4.2	Diagnóstico indirecto	33
2.1.5	Diagnóstico diferencial	36
2.1.6	Tratamiento de las ehrlichiosis y anaplasmosis	37
2.1.7	Respuesta al tratamiento y pronóstico de las ehrlichiosis y anaplasmosis	40
2.1.8	Control de las ehrlichiosis/anaplasmosis	42
2.1.9	Consideraciones de salud pública	44
2.1.10	Ehrlichiosis, anaplasmosis y neorickettsiosis en la especie felina	44
2.1.10.1	Etiología y epidemiología	45
2.1.10.2	Patogenia	48
2.1.10.3	Signos clínicos de la ehrlichiosis felina	49
2.1.10.4	Hallazgos laboratoriales de la ehrlichiosis felina	49
2.1.10.5	Diagnóstico	50
2.1.10.6	Diagnóstico diferencial	53
2.1.10.7	Tratamiento	53
2.1.10.8	Respuesta al tratamiento	54
2.1.10.9	Consideraciones para la salud pública	55
2.1.11	Situación de la ehrlichiosis en España	55

2.2	LEISHMANIOSIS	59
2.2.1	Introducción a la leishmaniosis	59
2.2.2	La Leishmaniosis canina	62
2.2.2.1	Cuadro clínico	65
2.2.2.2	Hallazgos laboratoriales	68
2.2.3	Diagnóstico	69
2.2.3.1	Métodos parasitológicos	70
2.2.3.2	Métodos serológicos	71
2.2.3.3	Métodos moleculares	73
2.2.4	Diagnóstico diferencial	74
2.2.5	Tratamiento	75
2.2.6	Control de la leishmaniosis canina	78
2.2.7	La leishmaniosis en la especie felina	79
2.2.7.1	Etiología y epidemiología	79
2.2.7.2	Signos clínicos de la leishmaniosis felina	81
2.2.7.3	Alteraciones laboratoriales de la leishmaniosis felina	83
2.2.7.4	Diagnóstico de la leishmaniosis felina	83
2.2.7.5	Diagnóstico diferencial de la leishmaniosis felina	85
2.2.7.6	Tratamiento de la leishmaniosis felina	85
2.2.8	La Leishmaniosis en España	86
2.3	BARTONELLOSIS	88
2.3.1	Etiología y epidemiología	88
2.3.2	Patogenia	92
2.3.3	Enfermedad del arañazo del gato (CSD)	93
2.3.4	Bartonellosis en el gato	95
2.3.4.1	Etiología y epidemiología	95
2.3.4.2	Patogenia	97
2.3.4.3	Cuadro clínico y hallazgos laboratoriales	99
2.3.4.4	Diagnóstico de las bartonellosis en el gato	99
2.3.4.5	Tratamiento de las bartonellosis	103
2.3.5	Prevención y consideraciones de salud pública de las bartonellosis	104
2.3.6	Bartonellosis en España	106
3	OBJETIVOS	109
4	MATERIALES Y MÉTODOS	113
4.1	Plan de trabajo	115
4.2	Animales	116

4.3	Recogida de datos de cada animal	120
4.4	Muestras	121
4.5	Analítica sanguínea	121
4.6	Diagnóstico serológico: Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	123
4.6.1	Antígenos empleados	123
4.6.2	Técnica	124
4.6.3	Puntos de corte	126
4.7	Cultivos celulares	127
4.8	Diagnóstico molecular: reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	132
4.8.1	Instalaciones	132
4.8.2	Extracción de ADN	134
4.8.3	Control de la extracción	134
4.8.4	Cuantificación de ADN y calidad del mismo	135
4.8.5	Procesado de las muestras mediante PCR	136
4.8.6	Premezcla de reactivos	140
4.8.7	Ciclos empleados	141
4.8.8	Lectura en gel de electroforesis	143
4.8.9	Purificación del ADN amplificado y secuenciación	145
4.8.10	Clonación en plásmidos	146
4.8.11	Sensibilidad de la reacción de PCR	146
4.8.12	Especificidad de la reacción de PCR	147
4.8.13	Árboles filogenéticos	147
4.9	Estudio estadístico	148
5	RESULTADOS	151
5.1	Descripción estadística de la población	153
5.2	Relación entre la seropositividad a los distintos agentes estudiados y diferentes variables en la población analizada	163
5.2.1	Seropositividad a <i>Ehrlichia canis</i>	163
5.2.1.1	Relación entre la seropositividad a <i>E. canis</i> y la procedencia, raza, sexo, edad y castraciones	164
5.2.1.2	Relación entre la seropositividad a <i>E. canis</i> y diferentes datos del entorno	166
5.2.1.3	Relación entre la seropositividad a <i>E. canis</i> y la presencia de enfermedades concurrentes	169
5.2.1.4	Relación entre la seropositividad a <i>E. canis</i> y el cuadro clínico	170

5.2.1.5	Relación entre la seropositividad a <i>E. canis</i> y el hemograma y análisis bioquímico sanguíneo -----	170
5.2.1.6	Árboles de decisión -----	173
5.2.2	Seropositividad a <i>A. phagocytophilum</i> -----	175
5.2.2.1	Relación entre la seropositividad a <i>A. phagocytophilum</i> y la procedencia, raza, sexo, edad y castraciones-----	176
5.2.2.2	Relación entre la seropositividad a <i>A. phagocytophilum</i> y diferentes datos del entorno 176	
5.2.2.3	Relación entre la seropositividad a <i>A. phagocytophilum</i> y la presencia de enfermedades concurrentes -----	179
5.2.2.4	Relación entre la seropositividad a <i>A. phagocytophilum</i> y el cuadro clínico-----	179
5.2.2.5	Relación entre la seropositividad a <i>A. phagocytophilum</i> y el hemograma y análisis bioquímico sanguíneo -----	180
5.2.2.6	Árboles de decisión -----	180
5.2.3	Seropositividad a <i>N. risticii</i> -----	182
5.2.3.1	Relación entre la seropositividad a <i>N. risticii</i> y la procedencia, raza, sexo, edad y castraciones-----	183
5.2.3.2	Relación entre la seropositividad a <i>N. risticii</i> y diferentes datos del entorno -----	183
5.2.3.3	Relación entre la seropositividad a <i>N. risticii</i> y la presencia de enfermedades concurrentes -----	184
5.2.3.4	Relación entre la seropositividad a <i>N. risticii</i> y el cuadro clínico-----	184
5.2.3.5	Relación entre la seropositividad a <i>N. risticii</i> y el hemograma y análisis bioquímico sanguíneo -----	184
5.2.3.6	Árboles de decisión -----	185
5.2.4	Seropositividad a <i>L. infantum</i> -----	186
5.2.4.1	Relación entre la seropositividad a <i>L. infantum</i> y la procedencia, raza, sexo, edad y castraciones-----	187
5.2.4.2	Relación entre la seropositividad a <i>L. infantum</i> y diferentes datos del entorno-----	188
5.2.4.3	Relación entre la seropositividad a <i>L. infantum</i> y la presencia de enfermedades concurrentes -----	188
5.2.4.4	Relación entre la seropositividad a <i>L. infantum</i> y el cuadro clínico -----	189
5.2.4.5	Relación entre la seropositividad a <i>L. infantum</i> y el hemograma y análisis bioquímico sanguíneo -----	189
5.2.4.6	Árboles de decisión -----	191
5.2.5	Seropositividad a <i>B. henselae</i> -----	191
5.2.5.1	Relación entre la seropositividad a <i>B. henselae</i> y la procedencia, raza, sexo, edad y castraciones-----	192
5.2.5.2	Relación entre la seropositividad a <i>B. henselae</i> y diferentes datos del entorno-----	193
5.2.5.3	Relación entre la seropositividad a <i>B. henselae</i> y la presencia de enfermedades concurrentes -----	194

5.2.5.4	Relación entre la seropositividad a <i>B. henselae</i> y el cuadro clínico	195
5.2.5.5	Relación entre la seropositividad a <i>B. henselae</i> y el hemograma y análisis bioquímico sanguíneo	195
5.2.5.6	Árboles de decisión	199
5.2.6	Seropositividad a más de un agente simultáneamente	200
5.2.6.1	Relación entre la seropositividad a más de uno de los agentes estudiados y la procedencia, raza, sexo, edad y castraciones	204
5.2.6.2	Relación entre la seropositividad a más de uno de los agentes estudiados y diferentes datos del entorno	205
5.2.6.3	Relación entre la seropositividad a más de uno de los agentes estudiados y la presencia de enfermedades concurrentes	206
5.2.6.4	Relación entre la seropositividad a más de uno de los agentes estudiados y el cuadro clínico	207
5.2.6.5	Relación entre la seropositividad a más de uno de los agentes estudiados y el hemograma y análisis bioquímico sanguíneo	207
5.3	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	209
5.3.1	Cuantificación del ADN	210
5.3.2	Sensibilidad de la PCR	210
5.3.3	Especificidad y límite de detección de la PCR	214
5.3.4	Resultados obtenidos mediante PCR	215
5.3.4.1	Housekeeping	215
5.3.4.2	PCR de <i>Ehrlichia</i> / <i>Anaplasma</i> / <i>Neorickettsia</i> spp.	216
5.3.4.3	PCR de <i>Leishmania</i> spp.	216
5.3.4.4	PCR de <i>Bartonella</i> spp.	219
5.3.5	Asociaciones estadísticas con los resultados moleculares	220
5.4	Frotis sanguíneos	220
5.5	Cultivos celulares	221
6	DISCUSIÓN	227
6.1.1	<i>Ehrlichia</i> spp.	229
6.1.2	<i>Anaplasma</i> spp.	235
6.1.3	<i>Neorickettsia</i> spp.	238
6.1.4	<i>Leishmania</i> spp.	239
6.1.5	<i>Bartonella</i> spp.	244
6.1.6	Seropositividad a más de un agente	250
7	CONCLUSIONES	255

8	RESUMEN	259
9	SUMMARY	263
10	BIBLIOGRAFIA	267

1 INTRODUCCIÓN

Existe una gran variedad de enfermedades transmitidas por vectores que pueden afectar y producir enfermedad en el hombre y distintas especies animales. Algunas de ellas han sido identificadas como especies nuevas y otras, particularmente aquellas cuyos agentes son difíciles de detectar mediante métodos convencionales, son reconocidas cada vez con más frecuencia, como resultado de una mejora en la sensibilidad de las técnicas diagnósticas, sobre todo aquellas basadas en la biología molecular (Irwin, 2002). La emergencia de enfermedades nuevas o la re-emergencia de otras enfermedades previamente controladas son el reto de la medicina humana y veterinaria. Debido sobre todo a cambios climáticos, los artrópodos, y con ello las infecciones que transmiten, están expandiendo su rango zoo-geográfico, accediendo con ello a nuevos medios (Gray, 2009). Así, algunas enfermedades emergentes se introducen en un área libre de ellas, considerándose entonces como enfermedades nuevas o exóticas para esa zona, lo cual está siendo cada vez más frecuente dado el mayor movimiento de animales de compañía junto a sus dueños, de unos países a otros (Shaw, 2001a).

Desde un punto de vista veterinario, las mascotas, entre ellas el perro y el gato, pueden ser potencialmente infectados por algunos de estos agentes, entre ellos especies de *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia*, *Leishmania* y *Bartonella*, y comportarse igualmente como reservorios para los mismos.

Cada vez se está dando más importancia a estas enfermedades en la especie canina, tanto por los efectos que pueden tener sobre el animal como por su potencial papel zoonótico, que viene ligado al estrecho contacto entre estos animales y sus dueños. En la especie felina, sin embargo, el conocimiento de estas enfermedades es mucho menor, si bien el contacto del hombre con el gato es similar al del perro en nuestro entorno geográfico. Por tanto, en el presente trabajo nos hemos centrado en estudiar y conocer el papel que tienen la ehrlichiosis, anaplasmosis, neorickettsiosis, leishmaniosis y bartonelosis en el gato, con el fin de conocer su importancia, tanto desde un punto de vista epidemiológico como clínico.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 EHRLICHIOSIS, ANAPLASMOSIS Y NEORICKETTSIOSIS

2.1.1 Introducción

La ehrlichiosis es una enfermedad causada por un tipo de bacterias Gram negativas, pleomórficas y de pequeño tamaño, que afectan a distintas especies animales, tanto domésticas como salvajes, y al hombre (Cohn, 2003). Estos agentes se comportan como parásitos intracelulares obligados, replicándose en forma de inclusiones en fagosomas en el citoplasma de leucocitos (linfocitos, monocitos y granulocitos), plaquetas, macrófagos y células endoteliales (Okada, 2003), característica que las diferencia de las rickettsias, que se replican directamente en el citoplasma de las células (Hotopp, 2006).

La ehrlichiosis fue reconocida por primera vez en perros en Argelia en 1935 (Donatien, 1935), aunque en la actualidad se considera una enfermedad de distribución mundial (Breitschwerdt, 1995a). La enfermedad adquirió gran importancia durante la Guerra de Vietnam, en la que veterinarios estadounidenses observaron un tipo de enfermedad en los perros de las Fuerzas Armadas, que desarrollaron lo que anteriormente se conocía como pancitopenia tropical canina, producida por *Ehrlichia canis* (Huxsoll, 1970).

Taxonómicamente podemos situar a los agentes productores de ehrlichiosis dentro del *Phylum Proteobacteria*, orden *Rickettsiales*, familia *Anaplasmataceae* (Dumler, 2001).

Tradicionalmente, las especies de *Ehrlichia* estaban clasificadas según su tropismo celular. Así, las ehrlichiosis se podían dividir en varios grupos: a) **monocíticas**, dentro de las que se encontraban *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia sennetsu* y *Ehrlichia risticii*; b) **granulocíticas**, en las que se englobaban *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia*

equi, el agente productor de la Ehrlichiosis Granulocítica Humana (EGH) y *Ehrlichia phagocytophila*; y c) **trombocíticas**, que incluían a *Ehrlichia platys*.

Este sistema tenía una serie de limitaciones, como el hecho de que el tropismo celular no era absoluto y una misma infección se podía observar en más de un tipo celular (Cohn, 2003).

Así, surgió una nueva clasificación más objetiva, y basada en la similitud de la secuencia del ARN ribosómico (ARNr) (Anderson, 1991) y el *groESL heat shock operon* (Dumler, 2001). Con ello, la familia *Anaplasmataceae* queda dividida en 3 genogrupos o géneros: *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Neorickettsia*. El primero de ellos, el género ***Ehrlichia***, incluye las especies *E. canis*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium* (antes llamada *Cowdria ruminantium*) y *E. muris*; el género ***Anaplasma*** incluye *A. phagocytophilum* (que engloba a las antiguas especies *E. equi*, *E. phagocytophila* y HGE debido a que se demostró que difieren en tan sólo tres nucleótidos, y entonces se considera la misma especie), *A. platys* (antes conocida como *E. platys*), *A. bovis* y *A. marginale*; y por último el género ***Neorickettsia***, en el que se encuentran *N. risticii* (antiguamente conocida como *E. risticii*), *N. sennetsu* (antiguamente *E. sennetsu*) y *N. helmintoeca*.

Existe una elevada reacción antigénica cruzada entre especies de un mismo genogrupo, puesto que comparten antígenos superficiales homólogos, siendo esta reacción cruzada menor entre especies de distintos genogrupos (Yu, 2000).

La transmisión de las ehrlichiosis, anaplasmosis y neorickettsiosis se realiza por medio de **vectores**. La distribución geográfica de los mismos influye directamente en la prevalencia de la enfermedad en una zona determinada (Hinrichsen, 2001). La infección por *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma* spp. se produce a través de las secreciones salivares de las garrapatas que pican a los animales o al hombre, mientras que la transmisión de *Neorickettsia* spp. se produce por medio de trematodos (Madigan, 2000). El ciclo biológico de estos vectores que actúan a través de trematodos es complicado e incluye otras especies animales, como babosas, peces e insectos acuáticos, que pueden transmitir la infección directamente a las mascotas o al hombre por ingestión de las mismas (Barlough, 1998; Reubel, 1998a; Kanter, 2000; Chae, 2000). En cuanto a la transmisión por medio de garrapatas, especies concretas de garrapatas se asocian con determinadas especies

ehrlichiales. Así, *E. canis* y *A. platys* se transmiten por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, que a su vez puede transmitir el agente *E. ewingii* (Groves, 1975; Smith, 1976; Cohn, 2003). Las garrapatas del género *Ixodes* spp. transmiten con mayor frecuencia *A. phagocytophilum*, mientras que *Amblyomma* spp. y *Dermacentor* spp. son conocidas transmisoras de *E. ewingii* y *E. chaffeensis* (Preziosi, 2002). Experimentalmente, *E. canis* puede transmitirse también a través de la garrapata *Dermacentor* spp. (Johnson, 1998).

Un mismo vector puede albergar distintos agentes y, a su vez, varias garrapatas pueden infectar un mismo animal, siendo responsables de infecciones simultáneas con distintos patógenos en el mismo hospedador, con lo que es posible la presencia de **infecciones concurrentes** (Breitschwerdt, 1998b). La coinfección con distintos agentes indudablemente complica el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. Los signos clínicos de enfermedad pueden producirse como consecuencia de la infección por distintos agentes que infectan al hospedador simultáneamente, o a los efectos sinérgicos o sumativos de muchos de ellos (Cohn, 2003). Sin embargo, también se ha sugerido que la coinfección por diversos agentes no altera el curso de la enfermedad (Mylonakis, 2004). A pesar de todo ello, algunos autores consideran que en general las infecciones por un solo agente parecen ser más comunes que las producidas por varios agentes simultáneamente (Belongia, 2002).

Puesto que estas infecciones han sido especialmente estudiadas en la especie canina, realizaremos una revisión al respecto, para, a continuación, abordar los escasos conocimientos que se tienen de las mismas en la especie felina.

2.1.2 Especies del género *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Neorickettsia* que afectan a cánidos

Entre las especies de *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Neorickettsia* que infectan al perro se encuentran *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *A. platys*, *A. phagocytophilum* y *N. risticii* (Neer, 2002).

2.1.2.1 *Ehrlichia canis*

Fue el patógeno ehrlichial primeramente estudiado y documentado (Donatien, 1935). Continúa siendo el principal agente productor de enfermedad clínica y de cuadros graves en el perro (Hoskins, 1988); igualmente es el agente causal de ehrlichiosis canina más importante y frecuente en nuestro país, y por tanto nos centraremos más en desarrollar los distintos aspectos de esta especie.

La ehrlichiosis monocítica canina (EMC), producida por *Ehrlichia canis*, fue la enfermedad ehrlichial descrita por primera vez, en 1935, por Donatien y Lestoquard, y se denominó en un primer momento *Rickettsia canis* (Donatien, 1935). En 1945 Moshokovskii red denominó a este agente como *Ehrlichia canis*, en honor al bacteriólogo alemán Paul Ehrlich (Moshokovskii, 1945).

E. canis ha sido descrita en países de todo el mundo, siendo endémica en zonas tropicales y subtropicales, aunque también se ha descrito en zonas templadas, incluida España (Keefe, 1982; Font, 1988).

Comúnmente se refiere a la enfermedad causada por *E. canis* como ehrlichiosis monocítica canina (EMC), debido a su predilección por las células monocíticas; sin embargo, debido a las históricas dudas surgidas en torno a su etiología, ha recibido múltiples denominaciones, como pancitopenia tropical canina, tifus canino, fiebre hemorrágica canina, síndrome hemorrágico idiopático, rickettsiosis canina o enfermedad del perro rastreador (Huxsoll, 1969, 1970; Woody, 1991).

No existe predisposición de edad o sexo en cuanto a la presentación de esta infección, si bien el Pastor Alemán parece una raza más susceptible de padecer la enfermedad, sufriendo una forma más grave de la misma y siendo el pronóstico peor que en otras razas, lo que podría estar asociado con una diferente respuesta inmunitaria en razas distintas (Nyindo, 1980).

E. canis se replica en células mononucleares de linfonódulos, hígado, bazo y médula ósea, tiene tropismo por los leucocitos y se encuentra habitualmente en los

monocitos y linfocitos (Huxsoll, 1970), aunque también se ha descrito en los neutrófilos (Ewing, 1971).

Se transmite principalmente, como hemos mencionado con anterioridad, a través de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* (Groves, 1975; Smith, 1976; Lewis, 1977). Experimentalmente también se puede transmitir por la garrapata *Dermacentor variabilis* (Johnson, 1998). *R. sanguineus* está distribuida por todo el mundo, con excepción de la Antártida, especialmente en zonas tropicales y subtropicales, incluida España (Ewing, 1969; Keefe, 1982; Hoskins, 1991; Estrada-Peña, 1995; Hua, 2000; Sucksawat, 2001b). *R. sanguineus* se infecta al ingerir sangre de un animal infectado y transmite la enfermedad a otro hospedador una vez que se alimenta de éste. La transmisión de *E. canis* a la garrapata se produce con mayor frecuencia durante las 2-3 primeras semanas de infección, porque los leucocitos infectados aparecen en mayor número durante las fases tempranas de la enfermedad (Hibler, 1986). Debido a que no existe transmisión transovárica en la garrapata, es decir, de una generación de garrapata a la siguiente, ésta no puede actuar como reservorio de la enfermedad (Groves, 1975; Smith, 1976). Sin embargo, existe transmisión transtadial, de forma que la garrapata adquiere el agente en su fase de larva o ninfa al alimentarse de un perro infectado, y lo transmite como ninfa o adulta. Se ha demostrado que estas garrapatas son capaces de transmitir la infección al menos durante 155 días tras infectarse, pudiendo sobrevivir el invierno en condiciones favorables e infectar animales susceptibles en primavera (Groves, 1975). *E. canis* puede permanecer mucho tiempo en el perro, por lo que distintos autores consideran también a este animal como reservorio de este agente (Huxsoll, 1975; Groves, 1975; Woody, 1991; Neer, 1998).

Al igual que en otras enfermedades transmitidas por garrapatas, el agente llega a sangre tras la picadura de la garrapata y desde allí infecta leucocitos circulantes y células del sistema mononuclear fagocitario (Walker, 1997). Este microorganismo inicialmente se desarrolla en forma de **cuerpos elementales** aislados con un diámetro de 0,5 a 0,9 μm (Nyindo, 1971). Los organismos penetran al interior de las células por endocitosis, mediada por receptores proteicos de la superficie celular (Messick, 1993), y una vez allí se cree que inhiben la fusión fagosoma-lisosoma, retrasando la apoptosis celular y facilitando la multiplicación de las bacterias. Los cuerpos elementales aumentan de tamaño, se replican por fisión binaria y se agrupan, llamándose entonces **cuerpos iniciales**, de 1,4 a 2 μm de diámetro (Nyindo, 1971). Continúa el crecimiento y replicación de estos

microorganismos dando lugar a las **mórulas**, llamadas así por su forma típica (Nyindo, 1971). Las mórulas están rodeadas por una membrana que engloba un numero variable de cuerpos elementales (Weiss, 1981), y que tiene un tamaño mayor a 2 μm . Los organismos se liberan de la célula hospedadora por lisis celular y exocitosis (Rikihisa, 1991). El ciclo de infección se completa en 12-18 días (Weiss, 1981).

Potencialmente, también se puede transmitir la enfermedad por medio de **transfusiones sanguíneas** a partir de donantes infectados con ehrlichiosis, puesto que se ha visto que es posible la infección experimental a través de transfusión sanguínea de unas especies animales a otras (Ristic, 1972; Groves, 1975; Neer, 1998; Arguin, 1999; Mc Quiston, 2000; Cohn, 2003; Reine, 2004). La transmisión directa de perros a humanos no se ha identificado (Parzy, 1991).

2.1.2.1.1 Cuadro clínico

En el curso de la ehrlichiosis canina, producida por *E. canis*, se pueden distinguir 3 fases: aguda, subclínica y crónica, aunque en la clínica esta distinción a veces no es tan clara (Woody, 1991). El cuadro clínico y las lesiones producidas en el curso de estas infecciones son consecuencia de la propia infección bacteriana, así como de la respuesta inmunitaria desencadenada por el hospedador: una elevada producción de anticuerpos en combinación con una respuesta celular disminuida tienen un papel fundamental en la patogenia de la enfermedad (Harrus, 1999).

La fase **aguda** aparece tras un período de incubación de 8-20 días tras la picadura de la garrapata y dura unas 2-4 semanas, durante las cuales el agente se multiplica y disemina por el organismo (Buhles, 1974). Igualmente se replica en células mononucleares, sobre todo del sistema mononuclear fagocitario, como ganglios, bazo, hígado y médula ósea, provocando en ellos una hiperplasia linforetica que produce un aumento en su tamaño (Reardon, 1981a). El agente se continúa diseminando por el organismo, afectando fundamentalmente a pulmones, riñones y meninges. Esta fase se caracteriza por ser típicamente leve o benigna (Harrus, 1999) y los signos son, en general, de tipo **inespecífico**, apareciendo fiebre, anorexia, pérdida de peso, apatía, depresión,

secreción oculo-nasal, mucosas pálidas, linfadenomegalia y hepato-esplenomegalia (Huxsoll, 1972; Buhles, 1974; Troy, 1980; Kuehn, 1985; Woody, 1991; Sainz, 1996b; Neer, 1998). En ocasiones se puede observar también edema en extremidades y escroto (Woody, 1991; Breitschwerdt, 1995a). Además pueden presentarse **signos hemorrágicos** como epistaxis, petequias y equimosis en piel y mucosas, aunque son más frecuentes en la fase crónica. No es infrecuente la aparición de **signos oculares** (Ristic, 1993; Leiva, 2005) como conjuntivitis, opacidad corneal (debido principalmente a edema y precipitados celulares), uveítis anterior, panuveítis, hipema, hemorragias retinianas e incluso desprendimiento de retina (Collins, 1991) o glaucoma secundario (Harrus, 1998a).

También se pueden encontrar signos **respiratorios**, como disnea, exudado oculo-nasal, cianosis y aumento de intensidad de los sonidos respiratorios, muchas veces debido a una neumonía intersticial que se puede apreciar radiológicamente (Codner, 1985).

En esta fase se pueden encontrar garrapatas en los perros, si bien no suele ser un hallazgo constante y sólo se ha constatado en un 40% de los animales afectados (Troy, 1980; Greene, 1985).

En la mayoría de los casos los signos clínicos se resuelven aparentemente sin tratamiento, progresando la enfermedad a la fase subclínica (Codner, 1986; Waner, 1997). En algunos animales se elimina el agente por una buena respuesta inmunitaria, sin necesidad de un tratamiento médico (Eddlestone, 2007).

Durante la fase **subclínica**, los pacientes parecen sanos desde un punto de vista clínico (Woody, 1991) y el agente parece estar localizado en células mononucleares del bazo (Harrus, 1998d). La duración de esta fase puede oscilar desde unas semanas (de 40 a 120 días) hasta años (Codner, 1986). No se conocen los factores que pueden influir en la progresión de la fase subclínica a la fase crónica ni se conoce el porcentaje de perros infectados que pasan a la fase crónica.

Es muy importante saber que un porcentaje considerable de perros, aparentemente sanos, que viven en áreas endémicas de ehrlichiosis, son seropositivos a *E. canis* y se encuentran en esta fase subclínica de enfermedad, pudiendo permanecer como portadores de este agente (Botros, 1995; Waner, 1997).

El bazo muy probablemente es el responsable de albergar a *E. canis* durante esta fase subclínica de enfermedad, hecho que puede influir en la patogenia de la misma (Harrus, 1998d).

En infecciones experimentales la anemia, trombocitopenia y leucopenia que aparecen en la fase aguda van disminuyendo hasta alcanzarse recuentos normales (Buhles, 1974). En infecciones naturales, estas alteraciones hematológicas suelen persistir (Codner, 1986). Así, se puede definir la fase subclínica como aquella en la que existe ausencia de signos clínicos con presencia de alteraciones hematológicas (Codner, 1986). Más concretamente, Breitschwerdt y colaboradores señalan que esta fase subclínica está caracterizada por presentar trombocitopenia, leucopenia variable y anemia sin la presentación de signos clínicos (Breitschwerdt, 1995a). En esta fase la respuesta inmunitaria predominante es de tipo humoral (Greene, 1984).

Las fases aguda y crónica de la ehrlichiosis están muy bien documentadas e investigadas, posiblemente por el hecho de que los animales en estas fases están clínicamente enfermos, lo que no ocurre en la fase subclínica, cuyo conocimiento es más limitado.

La ehrlichiosis canina frecuentemente se diagnostica durante la fase **crónica**. Los animales suelen llegar a esta fase debido a un sistema inmunitario ineficaz, que no es capaz de eliminar el agente causante de la enfermedad (Perille, 1991; Bartsch, 1996; Harrus, 1999). Los perros que llegan a esta fase se encuentran en un estado avanzado de la enfermedad y su pronóstico puede ser grave (Harrus, 1997b). Su gravedad depende de distintos factores como la virulencia de la cepa de *E. canis*, la edad del animal, raza, estado inmunitario, la existencia de enfermedades concurrentes y el estrés (Nyindo, 1980; Greene, 1984). El Pastor Alemán parece estar más predispuesto a padecer una forma más grave y crónica de la enfermedad y con peor pronóstico que el Beagle (Huxsoll, 1970; Nyindo, 1980).

En la fase crónica nos encontramos de nuevo con signos **inespecíficos** similares a los de la fase aguda, como letargia, anorexia, pérdida de peso, fiebre, mucosas pálidas, esplenomegalia y linfadenopatías, entre otros (Troy, 1980; Harrus 1997c, 1999; Frank,

1999). También pueden presentarse signos **hemorrágicos**, como melena, epistaxis, petequias o equimosis, hipema, hemorragias retinianas, hematomas subcutáneos y sublinguales, hematoquezia o hematuria, en un 25-60% de los casos (Troy, 1980; Frank, 1999; Mylonakis, 2004). De todos estos signos hemorrágicos, el más frecuente es la epistaxis, uni o bilateral (Huxsoll, 1970; Woody, 1991; Sainz, 1996b; Harrus, 1997c; Mylonakis, 2004). Igualmente se pueden encontrar en esta fase signos **oculares**, como conjuntivitis, uveitis anterior, hipema, neuritis óptica, glaucoma secundario, edema corneal, panuveítis, cambios retinales e incluso ceguera (Harrus, 1998a; Frank, 1999; Mylonakis, 2004; Leiva, 2005). Según algunos autores, el desprendimiento de retina es el signo ocular más común (Leiva, 2005); para otros, es más frecuente la uveitis anterior (Gelatt, 1991). También pueden aparecer signos **neurológicos** como ataxia, paraparesis, ataques, síndromes convulsivos, déficit de la propiocepción o nistagmo (Meinkoth, 1989; Woody, 1991; Frank, 1999). Estos signos neurológicos podrían atribuirse a hemorragias, vasculitis o infiltración plasmocitaria perivascular en meninges (Hibler 1986; Woody, 1991; Maretzki, 1994). Algunos casos pueden presentar alteraciones **locomotoras** por polimiositis, mono o poliartritis (Bellah, 1986; Cowell, 1988), pero la mayoría de las veces éstas son causadas por especies granulocíticas como *E. ewingii* o *A. phagocytophilum* (Cowell, 1988; Anderson, 1992). No es infrecuente encontrarse con problemas **cutáneos** asociados a la ehrlichiosis, mala calidad del pelo e incluso dermatitis alopécicas con eritema y descamación (Sainz, 1996b).

También es posible observar insuficiencia **renal**, habitualmente debida a glomerulonefritis, y síndrome nefrótico (Troy, 1980; Codner, 1992).

El aparato **reproductor** femenino también se puede alterar, presentándose abortos, esterilidad y muerte neonatal, entre otros (Woody, 1991).

Como síntomas **respiratorios**, pueden aparecer exudados nasales, disnea y tos, como resultado de una neumonía intersticial, observándose a nivel radiológico un patrón pulmonar intersticial (Codner, 1985; Kuehn, 1985; Sainz, 1996b; Frank, 1999).

La presencia de hemorragias en el **miocardio** puede producir síntomas como taquicardia o arritmias, que pueden acompañarse de disnea (Hibler, 1986; Woody, 1991).

En general, los signos clínicos podrían variar según el área geográfica, siendo en ocasiones atípicos, e igualmente se debe tener en cuenta la posibilidad de presentación de coinfecciones con otros agentes distintos, que pueden producir una sintomatología muy variada, complicando el diagnóstico (Trapp, 2006).

Con todo lo expuesto, aunque cada fase posee una sintomatología más o menos concreta, muchas de las manifestaciones clínicas pueden aparecer tanto en la fase aguda como en la crónica. Además, debido a la inconstancia y a la distinta intensidad de los síntomas, es difícil diferenciar clínicamente estas fases.

2.1.2.1.2 Hallazgos laboratoriales

Las alteraciones en la analítica son muy variables, pero en términos generales podemos afirmar que el dato hematológico más consistente en la fase **aguda**, y que permanece durante las demás fases, es la **trombocitopenia** (Huxsoll, 1970; Troy, 1980; Woody, 1991; Ristic, 1993; Harrus, 1997c; Waddle, 1988; Frank, 1999), aunque también existen casos con valores plaquetarios normales (Woody, 1991; Frank, 1999). Se han estudiado los mecanismos que pueden desencadenar esta trombocitopenia, como la inflamación del endotelio vascular y el consiguiente consumo de plaquetas (Abeygunawardena, 1990), el secuestro de plaquetas en el bazo (Pierce, 1977; Kakoma, 1978) y la destrucción inmunomediada o no inmunomediada de plaquetas (Weisiger, 1974; Smith, 1975) por anticuerpos antiplaquetas (Waner, 1995; Harrus, 1996b). Además de la trombocitopenia, puede haber trombocitopatías por alteraciones en la agregación plaquetaria, habiéndose identificado en perros con ehrlichiosis un factor de inhibición de la migración plaquetaria (PMIF), producido por los linfocitos B que induce cambios en la superficie de las plaquetas haciéndolas más susceptibles a su destrucción por células del sistema mononuclear fagocitario. (Kakoma, 1978, 1980). En esta fase la trombopoyesis funciona correctamente, por lo que hay un aumento del porcentaje de megatrombocitos (Pierce, 1977).

También es posible observar **anemia** (Kuehn, 1985; Harrus, 1997c; Frank, 1999) que puede variar de leve a intensa y que suele ser en un primer momento regenerativa, por

destrucción de hematíes por mecanismos inmunitarios (Reardon, 1981a), y en fases más avanzadas suele ser no regenerativa, por destrucción continua de glóbulos rojos, pérdida de sangre y aplasia medular (Woody, 1991). La eritrofagocitosis es un hallazgo común y algunos pacientes presentan un resultado positivo en el test de Coombs (Woody, 1991). Estos resultados sugieren la posibilidad de una unión inespecífica de anticuerpos a la superficie de los eritrocitos, lo que podría ayudar a la instauración de un cuadro hemolítico agudo en algunos casos (Breitschwerdt, 1995a). Además, el animal puede presentar inicialmente una **leucopenia** (Buhles, 1974; Reardon, 1981a) debida al secuestro de leucocitos por procesos inmunitarios e inflamatorios (Ristic, 1976), y posiblemente a la alteración en su funcionalidad por un factor citotóxico similar al PMIF y por otro factor inhibidor de la migración leucocitaria (Kakoma, 1977; Nyindo, 1980). Posteriormente, la leucopenia puede transformarse en **leucocitosis** (Hibler, 1986).

En cuanto a la bioquímica sanguínea, es frecuente observar en la fase aguda una **hiperproteinemia** originada por una hiperglobulinemia (Troy, 1980; Kuehn, 1985; Codner, 1986; Waddle, 1988; Sainz, 1998), a su vez provocada por una hipergammaglobulinemia (Burghen, 1971) habitualmente policlonal, con un aumento de las fracciones alfa-2, beta y gammaglobulinas, debido al incremento de la respuesta humoral en esta enfermedad (Harrus, 1997c). No obstante, la hiperglobulinemia también puede ser monoclonal, por aumento de las inmunoglobulinas G (Breitschwerdt, 1987; Harrus, 1996a). También se puede presentar una **hipoalbuminemia** por pérdida de proteínas en orina o por otras causas como la presencia de edemas, pérdida de peso o procesos inflamatorios (Hibler, 1986; Davoust, 1991). La funcionalidad hepática suele ser normal, aunque se han descrito aumentos ligeros en los valores de las **enzimas hepáticas** en el suero (Troy, 1980; Harrus, 1997c), que se pueden acompañar de **hiperbilirrubinemia** (Troy, 1990). El aumento en el valor de la **creatinina** podría tener un origen prerrenal (deshidratación) o renal, pudiéndose observar uremia asociada a glomerulonefritis y a plasmocitosis intersticial renal (Troy, 1980; Breitschwerdt, 1987).

En perros con problemas hemorrágicos, se pueden producir tiempos de hemorragia prolongados, aunque el tiempo de protrombina (TP), tiempo de tromboplastina (TTP) y los productos de degradación del fibrinógeno/fibrina (FDP's) pueden ser normales (Kuehn, 1985). La prolongación en los tiempos de hemorragia puede ser debida a una

trombocitopenia o a una trombocitopatía, pero la severidad de la hemorragia no suele estar correlacionada con el nivel de trombocitopenia (Woody, 1991).

Durante la fase **subclínica**, se puede observar **trombocitopenia**, con un aumento en el tamaño de las plaquetas, lo que sugiere una activa trombopoyesis y una buena actividad de la médula ósea. También se puede detectar **hiperglobulinemia**, **leucopenia** y **anemia** (Breitschwerdt, 1995a; Waner, 1997).

Las alteraciones laboratoriales que se pueden encontrar en la fase **crónica** incluyen **anemia** (Mylonakis, 2004) y **pancitopenia** por hipoplasia o aplasia medular que pueden acabar con la muerte del perro (Buhles, 1974; Kuehn, 1985; Mylonakis, 2004). Es frecuente detectar otras alteraciones clásicas en la bioquímica sérica como **hiperproteinemia**, producida por una hiperglobulinemia que a su vez es provocada por una hipergammaglobulinemia habitualmente policlonal (Kuehn, 1985), aunque no es infrecuente observar bandas monoclonales (Codner, 1986; Breitschwerdt, 1987). En algunos casos con afección hepática y/o proteinuria, se puede presentar una **hipoalbuminemia** (Harrus, 1996a; Mylonakis, 2004), que hace que los valores de proteínas séricas totales puedan ser normales, por lo que estaría recomendado realizar un proteinograma. También se pueden observar aumentos en los valores de **enzimas hepáticas** (Mylonakis, 2004). Los hallazgos más frecuentes en el urianálisis son **hematuria** y **proteinuria** (Frank, 1999; Mylonakis, 2004), habitualmente producidas por una glomerulonefritis inmunomediada similar a la encontrada en perros con leishmaniosis (Troy, 1980; Codner, 1992; Varela, 1997).

2.1.2.2 *Anaplasma platys*

Originariamente denominada *Ehrlichia platys*, se incluyó en el género *Anaplasma* y se denominó *A. platys* por su similitud en el gen ARN ribosómico 16S con otras especies incluidas dentro del género (Dumler, 2001). Es el único agente rickettsial con capacidad de infectar plaquetas en perros (Harvey, 1978).

Este agente fue descrito por primera vez en Estados Unidos en 1978 (Harvey, 1978). Actualmente su distribución es mundial, habiendo sido descrita en el continente americano, Asia, Oceanía, África y Europa (Kontos, 1991; Chang, 1996; Mathew, 1997; Harrus, 1997a; Sainz, 1999; Hua, 2000; Suksawat, 2001b; Motoi, 2001; Inokuma, 2001; Arraga-Alvarado, 2003; Sparagano, 2003; Unver, 2003).

Sus células diana son exclusivamente las plaquetas, observándose en inclusiones en cuyo interior pueden encontrarse de 1 a 8 microorganismos formando mórulas azuladas similares a las mórulas de *E. canis* (Harvey, 1978). La infección por esta especie supone el desarrollo de una **trombocitopenia** que suele ser **cíclica y recurrente** (Harvey, 1978).

Se piensa que este agente se transmite igualmente por la garrapata *R. sanguineus* (Hibler, 1986), dado que se ha detectado ADN de *A. platys* en esta especie de garrapata y que animales positivos a este agente estaban parasitados por *R. sanguineus* (Inokuma, 2000; Motoi, 2001; Sanogo, 2003; Sparagano, 2003; Yabsley, 2008). Por este motivo, es frecuente que coexista la infección por *E. canis* y *A. platys* en el mismo hospedador (Hoskins 1988; Hua, 2000; Waner, 2001). Sin embargo, no ha sido posible demostrar la capacidad de transmisión de *R. sanguineus* en estudios experimentales (Simpson, 1991). Al igual que ocurre con *E. canis*, *A. platys* se puede transmitir por transfusión sanguínea empleando sangre de un donante infectado (Breitschwerdt, 2003).

Tras un período de incubación de 8-15 días, se produce la parasitemia de las plaquetas y con ello el desarrollo de una **trombocitopenia** y una **linfadenomegalia** generalizada (Hibler, 1986; Gaunt, 1990). Otros signos clínicos posibles son: anorexia, depresión, fiebre, letargia, mucosas pálidas, pérdida de peso y secreción nasal (Kontos, 1991; Harrus, 1997a). También se ha asociado la presentación de uveítis a la infección natural por *A. platys* (Glaze, 1986). En cuanto a los cambios en el recuento plaquetario, al principio éste disminuye para volver a incrementarse posteriormente y alcanzar valores normales a los 3-4 días (Hibler, 1986; Hua, 2000). Aparece de nuevo una trombocitopenia al cabo de 1-2 semanas, para volver a recuperarse los valores normales; ello explica que la enfermedad se haya denominado trombocitopenia cíclica recurrente (Gaunt, 1990). El grado de trombocitopenia no parece depender de la tasa de parasitemia, siendo posible una trombocitopenia grave en casos de parasitemia baja (Harrus, 2004).

Algunos casos pueden presentar **alteraciones en el recuento leucocitario** y **anemia** (Baker, 1988). También puede aparecer una **hipoalbuminemia** e **hiperglobulinemia** (Glaze, 1986; Baker, 1988). Además, se ha observado experimentalmente, en las fases iniciales de la infección, una ligera **anemia** que suele ser normocítica, normocrómica y no regenerativa (Baker, 1988).

A pesar de la descripción de signos clínicos asociados a este agente, se han descrito diferentes grados de gravedad de los mismos según el área geográfica; así, en Estados Unidos parece que *A. platys* causa pocos signos clínicos (Hibler, 1986; Woody, 1991; Neer, 2002), mientras que en Israel, Francia y Grecia, *A. platys* parece más virulenta (Kontos, 1991; Harrus, 1997a). En un mismo país la virulencia parece igualmente diferente (Sainz, 1999; Aguirre, 2006), lo que hace pensar en la influencia de otros factores como el estado inmunitario, el estrés, u otros factores que pueden influir en la gravedad de los signos clínicos causados por este agente (Harrus, 1999; Aguirre, 2006).

2.1.2.3 *Ehrlichia chaffeensis*

La denominación de este agente procede de su aislamiento por vez primera en Fort Chaffee, Arkansas (Anderson, 1991; Dawson, 1991).

Fue la primera especie descrita como agente causal de ehrlichiosis en personas, en Estados Unidos. Puede llegar a ser mortal en humanos si no es tratada adecuadamente (Dumler, 1995).

Aunque afecta principalmente al hombre, también ha sido descrita en perros, venados y otros mamíferos de Estados Unidos, considerándose el ciervo como principal reservorio de esta especie (Dawson, 1992; Mueller-Anneling, 2000; Dugan, 2005).

Sus vectores son garrapatas (*Amblyomma americanum* y *Dermacentor variabilis*). Debido a la distribución geográfica de las mismas, *E. chaffeensis* se ha descrito en perros principalmente en Estados Unidos, aunque más recientemente también se ha descrito en perros en Corea (Kordick, 1999; Yu, 2008).

Este agente está estrechamente relacionado antigénicamente con *E. canis* y *E. ewingii*. Con *E. canis* comparte su tropismo celular por células mononucleares (Dawson, 1992). Es tal la similitud con *E. canis* que la única técnica diagnóstica que permite diferenciarlas es la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Breitschwerdt, 1998b).

Este agente puede provocar **signos leves o inaparentes** en el perro en infecciones experimentales (Dawson, 1992), o bien aparecer **signos más graves** como epistaxis, linfadenopatía, vómitos o uveítis anterior, clínicamente indistinguibles de los causados por *E. canis* o *E. ewingii* (Breitschwerdt, 1998b). Los perros infectados experimentalmente pueden igualmente desarrollar una trombocitopenia sin que presenten ningún otro signo clínico (Zhang, 2003).

2.1.2.4 *Anaplasma phagocytophilum*

Esta especie engloba a las especies anteriormente conocidas como *E. equi* (denominada así por su presencia en caballos, e igualmente causante de la ehrlichiosis granulocítica canina), HGE (agente de la *ehrlichiosis granulocítica humana*) y *E. phagocytophila* (causante de enfermedad en ganado). Esta unificación taxonómica se realizó ya que tras el análisis de su RNA ribosómico, se determinó que estos agentes resultaban ser la misma especie (Dumler, 1995).

Se considera una especie granulocítica, junto con *E. ewingii*, por su tropismo por neutrófilos y eosinófilos. A veces se refiere a ambas especies como agentes de “Ehrlichiosis granulocítica” (EG) (Greig, 2006b).

Los vectores de *A. phagocytophilum* son las garrapatas del género *Ixodes* (Parola, 1998), concretamente *I. ricinus* para el caso de Europa y Reino Unido, e *I. scapularis* e *I. pacificus* en Estados Unidos (Magnarelli, 1995; Reubel, 1998b).

Esta especie no es específica de hospedador, pudiendo infectar caballos, rumiantes, pequeños y grandes mamíferos salvajes, humanos y gatos, que podrían, a su vez, actuar como reservorios de este agente (Dumler, 1995; Petrovec, 1997; Walls, 1997; Bjöersdorff,

1999; de la Fuente, 2005a). Asimismo *A. phagocytophilum* puede infectar al perro (Lewis, 1975; Breitschwerdt, 1998b). Además, se piensa que las aves podrían tener un papel importante en la transmisión de este patógeno (Bjöersdorff, 2001; Daniels, 2002).

La distribución geográfica de este agente va a depender, una vez más, de la distribución de su vector. Así, este agente es endémico en algunas zonas de Estados Unidos (Greig, 1996; Goldman, 1998), y también se puede encontrar en otras áreas, incluida Europa (Johansson, 1995; Yeh, 1997; Baumgartner, 1999; Suksawat, 2001b; Stuen, 2002).

La infección experimental en perros produce **signos clínicos leves** de enfermedad. En perros infectados de forma natural se observan **signos inespecíficos** como fiebre, letargia, depresión, esplenomegalia y alteraciones laboratoriales del tipo de trombocitopenia, anemia, linfopenia e hipoalbuminemia (Lewis, 1975; Greig, 1996; Kohn, 2008). Es posible encontrar **poliartritis** en perros infectados por *A. phagocytophilum*, si bien éste es un síntoma más común en infecciones producidas por *E. ewingii* (Greig, 1996).

2.1.2.5 *Ehrlichia ewingii*

Esta especie fue descrita por primera vez en 1971, momento en que se pensaba que era una forma granulocítica de *E. canis* (Ewing, 1971). Su denominación se debe a Anderson en 1992 (Anderson, 1992). Esta especie también está incluida dentro de las especies granulocíticas, compartiendo grupo con *A. phagocytophilum* (Goldman, 1998).

Este agente puede producir enfermedad en el hombre, así como en el perro (Buller, 1999; Breitschwerdt, 1998b; Goodman, 2003) y otras especies animales, como el ciervo de cola blanca (Yabsley, 2002).

Se transmite por la garrapata *A. americanum* (Wolf, 2000), aunque experimentalmente también *D. variabilis* puede transmitir este agente, y posiblemente *R. sanguineus* (Anziani, 1990; Murphy, 1998; Cohn, 2003).

La identificación de mórulas en células granulocíticas no permite diferenciar una infección por *E. ewingii* de una infección por *A. phagocytophilum*; sin embargo, su

distribución geográfica en Estados Unidos es diferente, lo que ayuda a la hora de diferenciarlas (Cohn, 2003). A veces se habla de ambas especies como los agentes causales de “Ehrlichiosis granulocítica” (EG) (Greig, 2006a). *E. ewingii* causa una enfermedad estacional y regional que depende principalmente de su vector, *A. americanum*. Por tanto, se incluye a este agente en la lista de diagnósticos diferenciales en perros con fiebre aguda, cojera y/o problemas neurológicos en las zonas sureste, suroeste y costa atlántica de Estados Unidos, en épocas entre primavera y verano, que es cuando existe una mayor actividad del vector.

E. ewingii está muy relacionada genéticamente con *E. canis* y *E. chaffeensis* por lo que son frecuentes las reacciones cruzadas entre ambas (Waner, 2001). Como no existe una técnica serológica específica para el diagnóstico de *E. ewingii*, porque el agente no ha sido aún cultivado *in vitro*, la obtención de un resultado serológico positivo frente a *E. canis* puede indicar exposición a *E. canis*, *E. ewingii* o *E. chaffeensis* (Breitschwerdt, 1998b).

La enfermedad producida por este agente fue conocida originariamente como “síndrome de la poliartritis aguda” (Stockham, 1992). Aunque las poliartropatías son un signo muy común en la infección por *E. ewingii* (Stockham, 1992; Anderson, 1992; Goldman, 1998; Goodman, 2003), también puede provocar otro tipo de síntomas inespecíficos en el perro como fiebre, depresión, letargia, esplenomegalia, hepatomegalia, trombocitopenia y en algunos casos anemia (Goldman, 1998; Goodman, 2003) e incluso meningitis (Maretzki, 1994; Meinkoth, 1998).

Los signos suelen solucionarse con el tratamiento terapéutico adecuado, siendo infrecuente la presentación de cuadros graves (Preziosi, 2002).

2.1.2.6 *Neorickettsia risticii*

La enfermedad causada por *N. risticii* fue reconocida originariamente en caballos 1979 (Knowles, 1983) a lo largo del río Potomac en Maryland y Virginia, Estados Unidos.

La enfermedad se denominó ehrlichiosis monocítica equina o fiebre de los caballos de Potomac y su agente causal se denominó inicialmente *Ehrlichia risticii* (Holland, 1985b).

En 1988 se observó la capacidad de este agente de infectar experimentalmente al perro (Ristic, 1988), si bien no fue hasta 1994 cuando se describieron casos clínicos por infección natural en la especie canina (Kakoma, 1994).

Además de infectar caballos y perros, también se ha descrito la infección en gatos y otras especies animales (Dawson, 1988; Kakoma, 1994; Pusterla, 2000).

Sus células diana son los monocitos, los macrófagos y también los enterocitos, lo que explica la aparición de colitis en caballos (Madigan, 2000).

Se desconocen muchos aspectos sobre la infección por esta especie en perros. Su modo de transmisión es igualmente desconocido hasta la fecha, pero parece ser por medio de trematodos o nematodos que usan a las serpientes, peces e insectos acuáticos, entre otros, como hospedadores intermediarios (Reubel, 1998a; Barlough, 1998; Chae, 2000; Pusterla, 2000; Madigan, 2000). La ingestión de agua estancada parece ser una forma habitual de infección y podría explicar por qué es menos común la infección en perros y gatos que en caballos (Cohn, 2003).

Se ha identificado este agente en distintos países (Magnarelli, 1993; Barlough, 1997; Dutra, 2001). Recientemente se ha descrito su presencia en pescado comercializado en Francia procedente de distintos países asiáticos (Seng, 2008).

En perros con infección experimental causa infecciones **leves** o inaparentes (Ristic, 1988). También se han descrito casos de infección natural en perros, en los que podemos observar letargia, vómitos, alteraciones articulares y cambios en la analítica sanguínea (Kakoma, 1994). En contraste, debido a que los signos clínicos no son aparentes experimentalmente, algunos autores sugieren que los perros podrían servir como portadores de este agente sin manifestar signos clínicos (Woody, 1991).

Dado que *N. risticii* pertenece a un género diferente a *E. canis*, no es probable la presencia de reacciones cruzadas entre ambas especies (Kakoma, 1994).

2.1.3 Especies del género *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Neorickettsia* que afectan al hombre

Estos agentes son potencialmente zoonóticos y, por tanto, pueden producir enfermedad en la especie humana. De hecho, los avances relacionados con la ehrlichiosis en animales han contribuido a la rápida expansión del conocimiento de la ehrlichiosis en el hombre, sirviendo los animales como modelo comparado de patologías en medicina humana (Rikihisa, 1991; Walker, 1996).

Desde mediados del siglo XIX se comenzó a entender la importancia que tenían las garrapatas como transmisores potenciales de enfermedades a distintas especies animales y al hombre, pero no ha sido hasta finales del siglo pasado, con la emergencia de la Borreliosis de Lyme o la fiebre de las Montañas Rocosas cuando el interés por estos artrópodos y las enfermedades que transmiten ha cobrado una mayor relevancia (Oteo, 2002).

Las ehrlichiosis/anaplasmosis son también enfermedades potencialmente zoonóticas y se transmiten a los humanos a través de las picaduras de garrapatas, especialmente de los géneros *Ixodes*, *Amblyomma* y *Dermacentor*. Asimismo, está aumentando la descripción de picaduras por *R. sanguineus* en el hombre (Goddard, 1989; Carpenter, 1990; Perez, 1996, 2006; Manfredi, 1999). Algunos autores consideran que ello se debe a que la frecuencia con la que *R. sanguineus* se alimenta del hombre podría ser mayor de lo que se pensaba (Harrison, 1997), por lo que el hombre podría estar expuesto igualmente a las infecciones transmitidas por esta garrapata.

El primer caso de ehrlichiosis humana descrito data de 1954, y tuvo lugar en Japón (Misao, 1954). Se trataba de un paciente con un cuadro clínico similar a la mononucleosis infecciosa, y de él se aisló el agente *E. sennetsu* (actualmente conocido como *N. sennetsu*). La “Fiebre de Sennetsu”, como así la llamaban, es muy poco frecuente y generalmente de carácter benigno, sin casos mortales descritos (Beneson, 1990). Los síntomas clínicos más frecuentes son fiebre, malestar, dolor de cabeza, anorexia, insomnio, sudores, estreñimiento y linfadenopatía (Misao, 1954). La mayoría de los casos descritos por este

agente se sitúan en la zona oeste de Japón, siendo muy rara en otras latitudes (Rapmund, 1984). La transmisión de esta enfermedad está relacionada con el consumo de pescado crudo, infestado por parásitos que albergan *N. sennetsu* (Fukuda, 1954). Esta especie tiene predilección por los monocitos y macrófagos y está serológicamente relacionada con *E. canis* (Holland, 1985a; Nyindo, 1991). No obstante, estudios sobre la secuencia del ARN ribosómico muestran a *N. sennetsu* más relacionada con *N. risticii* (Shankarappa, 1992).

Además de *N. sennetsu*, se han descrito otras especies de *Ehrlichia* y *Anaplasma* capaces de producir enfermedad en personas, considerándose en la actualidad a las ehrlichiosis y anaplasmosis como enfermedades emergentes en medicina humana (Oteo, 2002)

2.1.3.1 Situación en Estados Unidos de las ehrlichiosis/anaplasmosis humanas

La mayoría de los casos de ehrlichiosis humana se comenzaron a describir en Estados Unidos, a mediados de la década de los 80. En 1986 se describió el primer caso de ehrlichiosis monocítica humana (EMH) en Estados Unidos. Se trataba de un paciente procedente de Detroit, de 51 años de edad, con historia de exposición a garrapatas, con sintomatología similar a la producida por la Fiebre de las Montañas Rocosas, pero serológicamente negativo al agente productor de esta enfermedad, *R. rickettsii*, y en el que se observaron inclusiones citoplasmáticas similares a las producidas por *Ehrlichia* spp. en monocitos. Resultó positivo a la serología frente a *E. canis*, con lo que se implicó a dicha especie como agente responsable, y se pensó en la posible emergencia de una nueva zoonosis (Maeda, 1987). Sin embargo, en 1990 se consiguió aislar el agente productor de esta enfermedad a partir de sangre de un paciente de la Armada estadounidense con sintomatología leve en Fort Chaffee (Arkansas) y de ahí la denominación de este nuevo agente como *E. chaffeensis*, demostrándose que se trataba de un agente diferente a *E. canis* (Anderson, 1991; Dawson, 1991). Este agente se transmite principalmente por la garrapata *Amblyomma*, concretamente *A. americanum* en Norteamérica (Anderson et al., 1992) y *A. variegatum* en África y Eurasia (Ramírez, 2001), y su principal reservorio en Estados Unidos lo constituyen los ciervos de cola blanca. Produce, como hemos

mencionado, la llamada EMH, por su predilección por los monocitos y macrófagos. *E. chaffeensis* está antigénicamente relacionada con *E. canis* y *E. ewingii*, responsables de ehrlichiosis canina (Anderson, 1991; Dawson, 1991).

En 1994, e igualmente en Estados Unidos, se describió una nueva entidad clínica en la especie humana, la ehrlichiosis granulocítica humana (EGH), en pacientes que presentaban fiebre e inclusiones citoplasmáticas en células granulocíticas, aparentemente similares a las producidas por *A. phagocytophila* y *E. equi*, y diferentes a *E. chaffeensis* (Chen, 1994; Bakken, 1994). Estudios moleculares en la secuencia del ARNr 16S mostraron una fuerte homología con *E. equi* y *E. phagocytophila*. De hecho, en la actualidad estos tres agentes quedan incluidos en una misma especie, denominada *A. phagocytophilum*, conociéndose la enfermedad a la que dan lugar como anaplasmosis granulocítica humana (AGH). Este agente, como hemos comentado, tiene predilección por células granulocíticas, especialmente neutrófilos y se transmite por garrapatas del género *Ixodes*, siendo su reservorio principal el ciervo.

En Estados Unidos se han descrito más de mil casos de EMH y AGH, siendo más frecuente la AGH que la EMH (Comer, 1999; McQuiston, 1999; Gardner, 2003; Demma, 2005). La EMH ha sido descrita con mayor frecuencia en el sureste y centro-Sur de Estados Unidos, mientras que la AGH se ha detectado con mayor frecuencia en el noreste y la costa oeste de los Estados Unidos (McQuiston, 1999). Estudios serológicos muestran tasas de seroprevalencia frente a *A. phagocytophilum* altas (15-36% de la población) en áreas endémicas (Dumler, 2005).

E. ewingii, conocido causante de enfermedad en perros, es el agente más recientemente reconocido como potencial agente zoonótico en Estados Unidos (Hmiel, 1998; Buller, 1999). Esta especie es responsable de un cuadro similar al producido por el agente de la AGH en pacientes, en su mayoría, inmunodeprimidos (Buller, 1999; Paddock, 2001). Se desconocen muchos datos acerca de la distribución geográfica, sus vectores de transmisión y el papel de este agente en medicina humana, aunque parece que los casos son más prevalentes en áreas donde existe la EMH (Buller, 1999).

E. canis, ampliamente distribuido por todo el mundo y transmitido por la garrapata *R. sanguineus*, se ha descrito como patógeno humano en Venezuela (Pérez, 1996, 2006).

Además, en este mismo país se ha observado la existencia de infección en el hombre, por un agente similar a *A. platys* (Arraga-Alvarado, 1999).

2.1.3.2 Situación en Europa de las ehrlichiosis/anaplasmosis humanas

En Europa, desde el primer caso de ehrlichiosis humana producido por el agente de la ehrlichiosis granulocítica humana (EGH), actualmente *A. phagocytophilum*, descrito en Eslovenia en 1997 (Petrovec, 1997), se han descrito unos 65 casos en distintos países europeos, como Suecia, Noruega, Bulgaria, Reino Unido, Francia, Italia, Polonia, Croacia, Portugal, Suiza y España, entre otros, aunque muchos de ellos no cumplan los criterios típicos de infección por el agente causal de la ehrlichiosis granulocítica (Sumpton, 1995; Brouqui, 1995; Sumpton, 1995; Lillini, 1996; Arraga-Alvarado, 1996; Bakken, 1996; Pusterla, 1997; Bjöersdorff, 1999; Christova, 1999; Oteo, 2000; Blanco, 2002; Ruscio, 2003; Zwolinski, 2004; de la Fuente, 2005b; Stanczak, 2006; Santos, 2006; Dokic, 2006; Misic-Majerus, 2006; Mastrandrea, 2006; Garcia, 2006). Este agente ha sido descrito también en niños (Arnez, 2001). Su vector de transmisión en el continente europeo, como hemos mencionado anteriormente, es *I. ricinus*. En distintos estudios de prevalencia de infección por *A. phagocytophilum* en personas y en los vectores (Oteo, 2001; Blanco, 2002), llama la atención la elevada prevalencia de este agente en las garrapatas, frente a la baja prevalencia de enfermedad en humanos. Esto se puede deber a una variedad de *A. phagocytophilum* muy habitual en garrapatas pero poco patógena para el hombre (Portillo, 2004).

Tan sólo han sido descritos en Europa 2 casos agudos presumiblemente producidos por *E. chaffeensis*, ambos fueron diagnosticados sólo mediante serología, y tuvieron lugar en Portugal y Bélgica (Morais, 1991; Pierard, 1995). Más recientemente, en el año 2003, se describió una nueva especie de *Ehrlichia* en Italia, denominada provisionalmente *E. walkerii*, en garrapatas del género *Ixodes*, lo que podría explicar algunos casos dudosos de EMH diagnosticados en Europa (Brouqui, 2003). Con todo esto, hasta la fecha no parece haber datos convincentes que confirmen la presencia en Europa de otras ehrlichiosis humanas distintas de la AGH, producida por *A. phagocytophilum*.

2.1.3.3 Signos clínicos de las ehrlichiosis en el hombre

Los signos clínicos observados con mayor frecuencia en el curso de una ehrlichiosis o anaplasmosis humana pueden variar desde leves o asintomáticos, hasta graves o incluso mortales (Unver, 1999). Los síntomas comienzan aproximadamente a los 7 días post-infección. Clínicamente la enfermedad se confunde con la Fiebre Maculosa de las Montañas Rocosas (RMSF), pero difiere de ella en que es raro encontrar los sarpullidos o erupciones que se suelen observar en la RMSF. Suele aparecer en primer lugar una fiebre elevada y cefalea, que no responden a analgésicos y antipiréticos. También pueden aparecer escalofríos, sudor, náuseas, vómitos, anorexia, dolores musculares y malestar general (Dumler, 1998). Dado que estos agentes invaden los leucocitos, el sistema inmunitario suele verse afectado, pudiendo favorecerse la presentación de otras infecciones concomitantes. En algunos casos las manifestaciones clínicas pueden agravarse; así, en el caso de ehrlichiosis englobadas dentro de las EMH, algunas de las complicaciones son insuficiencia renal aguda, síndrome del distrés respiratorio del adulto, coagulación intravascular diseminada y erupción cutánea (Eng, 1990; Dumler, 1995). La infección del sistema nervioso central suele causar confusión, fotofobia, estupor, alucinaciones, hiperreflexia, mioclonias, visión borrosa, parálisis de pares craneales, convulsiones y coma. Para el caso de las EGH, son más frecuentes las complicaciones debido a infecciones oportunistas, como candidiasis, aspergillosis pulmonar y criptococosis. Se pueden producir septicemias, miocarditis, afecciones neurológicas, como plexopatía braquial, polineuropatía o meningoencefalitis (Ramírez-Ortega, 2001).

Las alteraciones en los datos laboratoriales presentes tanto en la EGH como en la EMH incluyen anemia, leucopenia y trombocitopenia, así como un aumento en los valores de enzimas hepáticas (Maeda, 1987; Everett, 1994; Walker, 1996; Paddock, 1997).

Se han descrito más casos en hombres que en mujeres (Fishbein, 1994), y la edad media de presentación de la EGH en personas oscila entre los 43 y los 60 años (Aguero-Rosenfeld, 1996; Bakken, 1996). Algunas veces la enfermedad se resuelve espontáneamente, mientras que otras veces se requiere el tratamiento con antibióticos. La infección es más grave en personas mayores e inmunocomprometidas, e igualmente

cuando se produce un retraso en el diagnóstico y tratamiento. No es frecuente pero en algunos casos se puede producir la muerte del paciente (5%) (Beneson, 1990; Eng, 1990; Spach, 1993; Bakken, 1996).

No existen pruebas acerca de la posible transmisión directa de una persona infectada a otra sana (Beneson, 1997). Hasta el momento no se han desarrollado vacunas frente a esta enfermedad.

2.1.4 Diagnóstico de las ehrlichiosis y anaplasmosis

La historia clínica, sobre todo teniendo en cuenta la exposición a vectores, junto con los signos clínicos y las alteraciones laboratoriales, nos puede orientar en el diagnóstico. No obstante, estos hallazgos no suelen ser concluyentes, dada la naturaleza inespecífica de los mismos. Por tanto, el diagnóstico definitivo debe basarse en pruebas laboratoriales que determinen directa o indirectamente la presencia del agente patógeno en el animal.

2.1.4.1 Diagnóstico directo

El diagnóstico definitivo se puede basar en la **observación** de las inclusiones citoplásmicas características de estos agentes (Elias, 1991; Mylonakis, 2003), denominadas, como hemos mencionado con anterioridad, cuerpos elementales (0,5-0,9 μm de diámetro), cuerpos iniciales (1,4-2 μm de diámetro), o mórulas (>2 μm de diámetro), a partir de frotis sanguíneos o de aspirados de bazo, médula ósea, pulmón, hígado o linfonódulos, o bien en líquido cefalorraquídeo, sinovial o incluso prostático (Bellah, 1986; Elías, 1991; Meinkoth, 1998; Neer, 2006). Los frotis se suelen teñir con los colorantes de hematología habituales (Giemsa o Romanowsky). Según algunos autores, si se lleva a cabo un cultivo primario de leucocitos sanguíneos, el número de mórulas detectadas es mayor que en muestras de sangre, linfonódulos o médula ósea (Mylonakis, 2003).

En el caso de la sangre, el uso de técnicas de leucoconcentración por centrifugación o sedimentación también aumenta la probabilidad de identificar las mórulas, al seleccionarse principalmente las células blancas (Huxsoll, 1970). Algunos estudios han observado en perros un 3-34% de infección en los leucocitos (Egenvall, 1998).

A pesar de que la observación del agente causal es una técnica específica, es poco sensible, ya que las mórulas aparecen con mayor frecuencia en la fase aguda y de forma transitoria, por una mayor presencia de leucocitos infectados en esta primera fase, por lo que no es fácil su detección (Troy, 1980; Greene, 1984; Kuehn, 1985; Hibler, 1986). Por tanto, un resultado negativo no descartaría la infección. Además, es necesario personal entrenado y cualificado para la detección de las mórulas, dado que es fácil confundirlas con artefactos, tinciones mal realizadas u otras inclusiones (Mylonakis, 2003). En el caso de *A. platys*, las mórulas aparecerían en las plaquetas, pero dada la naturaleza cíclica de aparición del agente en las plaquetas en la ehrlichiosis producida por *A. platys*, no compensa realizar esta técnica (Harrus, 1997a).

En general, en perros con ehrlichiosis sólo un 4% de los frotis evaluados suelen ser positivos (Woody, 1991).

También es posible el **cultivo** del agente en líneas celulares específicas para cada especie (Nyindo, 1971), y a pesar de ser una técnica específica, tiene los inconvenientes del precio y el elevado tiempo que requiere el agente para su crecimiento (14-34 días incluso) (Iqbal, 1994), por lo que se usa casi exclusivamente en labores de investigación. El cultivo de los agentes *in vitro* es un requisito previo para el uso de técnicas serológicas, como la inmunofluorescencia indirecta (IFI), dado que se utilizan los agentes que crecen en cultivo como antígeno de la reacción serológica.

E. canis se ha cultivado satisfactoriamente en monocitos sanguíneos caninos, macrófagos peritoneales caninos, hibridomas y macrófagos peritoneales de ratón; también crece satisfactoriamente en líneas celulares específicas, como en la línea MDH-SP y la DH82 (Rikihisa, 1991).

N. risticii y *A. phagocytophilum* crecen en cultivos primarios a base de monocitos caninos y de sangre procedente de ovino, así como en líneas celulares específicas como la

HL-60 en el caso de *A. phagocytophilum* y la P388D1 de ratón, T-84 y U-937 en el caso de *N. risticii* (Rikihisa, 1991).

Las **técnicas moleculares**, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR, han demostrado ser métodos sensibles y específicos para detectar estas infecciones. Esta técnica permite detectar cantidades muy pequeñas de una secuencia de ADN o ARN específica de un microorganismo y amplificarla logarítmicamente, de manera que sea posible detectarla por métodos visibles, como la electroforesis, que nos mide el tamaño del fragmento amplificado y el patrón de migración. Para que se produzca la reacción, se utilizan cebadores específicos que se unen a la porción de ADN a amplificar. Los cebadores usados pueden ser de tipo genérico, que permiten detectar la mayoría de organismos que pertenecen al género en cuestión, o específicos de especie, que ayudan a identificar especies concretas (Breitschwerdt, 1998a). Muchos laboratorios utilizan en primer lugar los cebadores genéricos y, si se obtiene un resultado positivo, ya se usan cebadores más específicos de especie, para identificar el agente en concreto. Normalmente se utiliza sangre completa en EDTA para la realización de la técnica. En el caso de *E. canis*, la PCR permite detectar el organismo a los 4-10 días post-infección (Iqbal, 1994; Wen, 1997), en ocasiones, antes de que se produzca la seroconversión. La PCR teóricamente detecta infección activa por el organismo, dado que detecta ADN del mismo. Esta técnica ayuda a confirmar la eliminación terapéutica del organismo; así, la técnica permite distinguir entre animales tratados pero con infección persistente de aquellos en los que el tratamiento ha tenido éxito pero que poseen títulos elevados de anticuerpos y por tanto son positivos en la serología (Wen, 1997; Harrus, 1998b). Sin embargo, la técnica posee algunos inconvenientes, como su precio, la falta de estandarización entre laboratorios o la aparición de falsos negativos o falsos positivos (McBride, 1996). Los falsos negativos se podrían deber a una incorrecta extracción de ADN, presencia de inhibidores de la PCR, como la heparina, problemas relacionados con la técnica o con la muestra de la que se obtiene el ADN, o a que en fases crónicas la sensibilidad puede ser menor debido a que la presencia del organismo en sangre es menor, o incluso podría estar secuestrado en otros tejidos. Los falsos positivos se podrían producir por una contaminación con ADN no procedente de la muestra o amplificaciones inespecíficas (Neer, 2006). Por tanto, el Grupo de Estudio de Enfermedades Infecciosas del Colegio Americano de Medicina Interna Veterinaria (ACVIM) recomienda usar la PCR en combinación con la serología para el diagnóstico de estas enfermedades (Neer, 2002). La

técnica de PCR empleada varía en función de los laboratorios y del agente objeto de estudio; así, para el diagnóstico de estas enfermedades se pueden usar técnicas de PCR de un solo paso o simples (Iqbal, 1994), en las que en una sola reacción obtenemos la amplificación deseada. El problema de este tipo de PCR es la unión de los cebadores a regiones incorrectas del ADN, dando productos inesperados; por ello, se desarrolló otro tipo de PCR, que es una variación de la PCR simple, llamada PCR anidada o “nested” (Wen, 1997), en la que se emplean dos grupos de cebadores en dos reacciones de PCR sucesivas, siendo la segunda reacción destinada a amplificar el producto obtenido en la primera reacción de PCR, reduciendo así la contaminación posible por uniones inespecíficas de los cebadores. Esta PCR es considerada por muchos autores como más específica que la PCR simple (Wen, 1997).

Más recientemente se viene usando la **PCR en tiempo real** (Bell, 2005), en la que se usan marcadores o sondas fluorescentes que permiten la monitorización continua de la formación del amplicón o producto de la PCR a lo largo de la reacción (Williams, 1998), permitiendo así la cuantificación de los productos obtenidos en cada muestra y en cada ciclo.

También se utiliza otro tipo de técnicas moleculares para la detección de estos agentes, como la PCR con hibridación en fase sólida (RLB), la cual permite detectar estos organismos con una elevada sensibilidad y especificidad (Sparagano, 2003). Esta técnica está basada en sondas de DNA específicas de especie y género y permite identificar infecciones mixtas y diagnosticar distintos patógenos al mismo tiempo (Sparagano, 2003).

2.1.4.2 Diagnóstico indirecto

La **serología** es una de las técnicas más comúnmente empleadas para el diagnóstico de estas enfermedades. Consiste en detectar la presencia del agente mediante la valoración de la respuesta inmunitaria humoral del hospedador, midiendo la producción de anticuerpos. Se puede observar un título elevado de anticuerpos tras la exposición al agente, en cualquier fase de la enfermedad, e incluso tras el tratamiento (Cohn, 2003). Un título positivo en una zona endémica no confirma que la infección sea causada por el

organismo en cuestión, confirma sólo exposición al agente. No obstante, un título positivo, unido a la presentación de signos clínicos o alteraciones laboratoriales, sería diagnóstico (Neer, 2002). Un título negativo tampoco descarta la infección, como veremos más adelante. Exista infección activa o no, por tanto, la interpretación de los resultados debería realizarse siempre conjuntamente con el caso clínico y no de forma aislada.

La técnica de inmunofluorescencia indirecta (**IFI**) es una técnica descrita por Ristic y colaboradores en 1972, de alta sensibilidad y especificidad, fácil manejo y bajo coste, y se la considera la técnica serológica “*gold-standard*” (Ristic, 1972; Waner, 2001; Neer, 2002). A pesar de que se han desarrollado otros métodos de diagnóstico de estas infecciones, continúa usándose esta técnica con mucha frecuencia (La Scola, 1999). En ella se emplean generalmente cultivos celulares infectados como antígeno (Ristic, 1972; Dawson, 1991). En ocasiones nos permite detectar anticuerpos frente al agente en cuestión a los 7 días post-infección, aunque muchos pacientes seroconvierten más tarde, a veces incluso 28 días post-infección (Ristic, 1972; Buhles, 1974). Aquellos animales que se encuentran muy graves o moribundos pueden ser incapaces de desarrollar anticuerpos frente al agente (Weisiger, 1975; Waner, 2001). Por tanto, cuando sea posible, se recomienda repetir la prueba 2-3 semanas después para buscar una seroconversión en casos sospechosos que presentan un resultado serológico negativo. En los primeros 4-7 días los anticuerpos suelen ser inmunoglobulinas tipo A y M, y a los 15 días aproximadamente predominan las inmunoglobulinas tipo G (Weisiger, 1975; Waner, 2001). La aparición de los anticuerpos Ig G parece depender de la cantidad de organismos infectantes (Rikihisa, 1992). Así, estudios experimentales muestran que es posible detectar los anticuerpos Ig G a los 3 días post-infección cuando la carga infectante es muy elevada (Iqbal, 1994). La mayoría de los laboratorios suelen evaluar este último tipo de anticuerpos. En general, los títulos bajos se deben confirmar unas semanas después, con la demostración de una seroconversión en 2 análisis sucesivos.

Algunas limitaciones de la técnica de IFI son, por ejemplo, que sólo se puede realizar en laboratorios especializados, que la lectura de los resultados es subjetiva, y que no diferencia entre infecciones por diferentes agentes próximos (Breitschwerdt, 1998). Tampoco existe estandarización entre laboratorios y, de hecho, se pueden observar resultados discordantes de una misma muestra de suero en distintos laboratorios (Kakoma, 2000).

Algunos autores afirman que, al realizar la técnica de IFI usando antígenos autóctonos, el título obtenido es ligeramente mayor que cuando se emplean antígenos foráneos (Keysary, 1996; Aguirre, 2008).

Son posibles las **reacciones cruzadas** entre distintas especies de la familia *Ehrlichiaeae*, lo que puede suponer un problema en la interpretación de los resultados de la serología (Neer, 1998; Breitschwerdt, 1998a), aunque los títulos suelen ser mayores para el agente que realmente está causando la infección (Woody, 1991). Así, la obtención de títulos bajos no suele ser diagnóstica y puede significar exposición a otros organismos diferentes al buscado. Las reacciones cruzadas son causadas por proteínas externas de membrana inmunodominantes que tienen un tamaño similar. *E. canis* podría tener reacción cruzada con *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *E. ewingii*, *N. helminthoeca* y con *A. phagocytophilum* (Rikihisa, 1991b; Shankarappa, 1992; Waner, 2001, 2001b; Neer, 2006). Por tanto, un problema asociado a estas técnicas es la obtención de resultados falsos positivos, es decir, obtener un resultado positivo cuando realmente es otro agente distinto al diana el que provoca la infección (Neer, 2006). En cualquier caso, desde un punto de vista clínico, todos estos agentes son parecidos y su abordaje clínico y terapéutico es similar.

Aunque se recomienda usar la serología y la PCR conjuntamente para el diagnóstico de estas enfermedades, algunos estudios muestran una baja correlación entre los resultados de ambas técnicas (Seaman, 2003). Así, por ejemplo, en un estudio se ha demostrado, empleando la IFI y la PCR conjuntamente, que sólo el 50% de animales seropositivos eran positivos por PCR a *E. canis* (Wen, 1997). Existen, además, casos de ehrlichiosis refractaria en los que no ha sido posible detectar al agente mediante PCR, ni en cultivo, ni ha sido satisfactoria la transmisión de la enfermedad inoculando a otro animal sano, lo que sugiere que la persistencia de anticuerpos frente a un agente junto con signos clínicos y laboratoriales después de un tratamiento anti-rickettsial no está siempre asociado a la identificación del organismo mediante técnicas moleculares (Breitschwerdt, 2001).

Debido a la masiva producción de antígenos de estos agentes en cultivos en líneas celulares, se han desarrollado otras técnicas inmunológicas para el diagnóstico de estas

infecciones, como el *enzyme-linked immunosorbent assay* o **ELISA** y el **inmunoblot** (Nyindo, 1991; Rikihisa, 1992; Hegarty, 1997; Waner, 2000; Harrus, 2002).

La técnica de **ELISA** aplicada al diagnóstico de *E. canis*, sirve para la detección de anticuerpos de tipo Ig G frente a este agente en la muestra. Existen tests comerciales que emplean antígeno completo o proteínas inmunodominantes y que ponen esta técnica al alcance de los clínicos (Waner, 2000; Harrus, 2002), sin necesidad de equipo especial ni personal cualificado. Algunos autores consideran estas técnicas como específicas y bastante sensibles (Harrus, 2002; Davoust, 2006). No obstante, existen numerosos estudios comparando las técnicas de IFI, western blot y ELISA comercial, mostrando una baja correlación, especialmente a títulos bajos (O'Connor, 2006), por lo que algunos autores la consideran poco fiable (Waner, 1996).

El **inmunoblot** respalda a las técnicas de IFI y ELISA en cuanto a que sirve para caracterizar y distinguir las diferentes especies responsables de la infección (Rikihisa, 1994), hecho que puede ser relevante, especialmente debido a la existencia de reacciones cruzadas. El **western blot** para *E. canis* pone de manifiesto un gran número de proteínas reactivas, siendo las más predominantes las de 22 a 30 kDa (Matthewman, 1993; Hegarty, 1997). Concretamente, entre los distintos antígenos proteicos de membrana de *E. canis*, las proteínas en el rango de 30 kDa constituyen los antígenos dominantes (Rikihisa, 1994; Ohashi, 1998). Usando esta técnica de Western blot se pueden detectar anticuerpos frente a *E. canis* a los 2-8 días post infección.

2.1.5 Diagnóstico diferencial

Debido a la naturaleza inespecífica de los signos clínicos de la ehrlichiosis canina, es posible confundirla con otras patologías que cursan con una sintomatología similar (Woody, 1991); entre ellas están el **lupus eritematoso sistémico**, el **mieloma múltiple**, el **linfoma** o la **leucemia linfocítica crónica** (Weiser, 1991; Heeb, 2003).

Dado que el hallazgo de una trombocitopenia es frecuente en el curso de las ehrlichiosis, debemos también diferenciar estas infecciones de una **trombocitopenia**

inmunomediada; sin embargo, en esta última no solemos detectar los síntomas generales de la ehrlichiosis, a pesar de que sí encontramos los cuadros hemorrágicos (Troy, 1990).

Otros agentes como *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp., y *Bartonella* spp., que comparten vector con los agentes ehrlichiales y, a veces, también sintomatología, deben ser descartados (Bool, 1957; Elias, 1988; Klag, 1991; Ramírez, 2001; Trapp, 2006).

En nuestro entorno geográfico, es frecuente confundir la ehrlichiosis con la **leishmaniosis** (Tesouro, 1993; Sainz, 1996b; Guillén, 2002), dado que comparten muchos síntomas clínicos, si bien son fácilmente distinguibles mediante técnicas serológicas y moleculares. En cualquier caso, debemos tener en cuenta la elevada frecuencia de presentación conjunta de ambas enfermedades en un animal.

De cara al diagnóstico, es importante valorar la presencia de enfermedades **concurrentes** con la ehrlichiosis. De nuevo, la mayoría de las concurrencias en el perro en España se deben a *Leishmania* spp. y *Ehrlichia* spp. En casos en los que se trata una de las enfermedades y se produce un descenso en el título de anticuerpos para ese agente, pero persisten los signos clínicos, hay que pensar en la posibilidad de que sea el otro agente el que produce parcialmente el cuadro clínico. También se encuentran casos en los que aparece una infección concurrente entre *Ehrlichia* spp. y *Babesia* spp. (Klag, 1991), especialmente en el norte de España, con *Hepatozoon* spp. (Bool, 1957; Elias, 1988) o con moquillo (Sainz, 1996b). En ocasiones en las que existe infección concurrente de varios agentes, a veces no es posible diferenciar cuál de los agentes es el principal causante de los signos clínicos (Frank, 1999).

2.1.6 Tratamiento de las ehrlichiosis y anaplasmosis

A veces es difícil evaluar cuándo instaurar un tratamiento en función de los resultados obtenidos en las pruebas laboratoriales y la presentación o no de signos clínicos. Dada la posibilidad de que no exista correlación entre los resultados serológicos y moleculares, algunos autores consideran que, ante una serología positiva, una PCR negativa, y la ausencia de síntomas, no se recomienda el tratamiento, y se deberían volver a

analizar los animales mediante IFI y PCR dos meses más tarde, y si la IFI es negativa y la PCR positiva, a pesar de que no existan signos clínicos en áreas endémicas, se recomienda el tratamiento (Wen, 1997).

Por el contrario, el Grupo de Estudio de Enfermedades Infecciosas del Colegio Americano de Medicina Interna Veterinaria (ACVIM) recomienda tratar al animal cuando se obtiene una serología positiva con signos clínicos (Neer, 2002).

El tratamiento de estas infecciones incluye un tratamiento farmacológico específico y una terapia de apoyo. Entre los fármacos eficaces frente a estos agentes se incluyen: tetraciclinas, cloranfenicol, dipropionato de imidocarb y amicarbalida, entre otros. Es preciso iniciar el tratamiento lo antes posible, dado que cuando se llega a la fase crónica es más difícil la recuperación por parte del animal (Mylonakis, 2004).

La **tetraciclina** y **oxitetraciclina** se han venido usando tradicionalmente, con una buena eficacia (Ewing, 1969; Buhles, 1974); sin embargo, la **doxiciclina** y la **minociclina** son los fármacos de elección y se usan con mayor frecuencia que las anteriores, debido a su excelente absorción, su sencilla administración y una menor nefrotoxicidad (Breitschwerdt, 1998b). Su administración es oral, aunque la doxiciclina se puede administrar también vía intravenosa. La duración del tratamiento es variable; el Grupo de Estudio de Enfermedades Infecciosas del Colegio Americano de Medicina Interna Veterinaria (ACVIM) recomienda una dosis mínima diaria de 10mg/kg de doxiciclina durante 28 días (Neer, 2002). Algunos autores consideran que a veces un tratamiento prolongado, incluso de 6 semanas, no es suficiente para eliminar dichos agentes (Harrus, 1998b). Un efecto no deseado de las tetraciclinas es la producción de estados carenciales, dado que quelan iones como el calcio, magnesio o hierro (Longhofer, 1988) y su fijación en huesos y dientes, provocando en estos últimos una típica coloración amarillenta. Por ello, no es recomendable su administración en gestantes y cachorros. La doxiciclina produce estos efectos con menor frecuencia que el resto de tetraciclinas.

El **cloranfenicol** se ha utilizado fundamentalmente en cachorros menores de 5 meses y hembras gestantes y lactantes (Woody, 1991), para evitar los efectos colaterales de coloración dentaria de las tetraciclinas. Los protocolos de tratamiento utilizados varían de 15 a 50 mg/kg cada 8 horas durante 14 días, vía oral, intravenosa, o subcutánea (Troy,

1990; Woody, 1991). Algunos autores recomiendan su empleo en perros con infecciones persistentes, a pesar de su tratamiento con tetraciclinas (Troy, 1990). Se debe evitar su uso en animales anémicos o pancitopénicos, dado que este fármaco altera la síntesis de hemoglobina en médula ósea. Debido a su toxicidad y a su efectividad cada vez más controvertida, éste no es un fármaco de primera elección (Troy, 1990).

El **dipropionato de imidocarb** puede ser una alternativa terapéutica en el tratamiento de las ehrlichiosis. Se administra inyectado, a dosis separadas de 5-7 mg/kg cada 15 días, vía intramuscular o subcutánea (Matthewman, 1994; Sainz, 2000b). Al ser un fármaco de carácter ácido, puede producir dolor y, en ocasiones, nódulos en el punto de inyección (Villemin, 1984). Puede causar efectos anticolinesterasa, como salivación, disnea, taquicardia, temblores o diarrea (Woody, 1991), que se pueden revertir mediante el uso de atropina o glicopirrolato (Cohn, 2003). Existen estudios que consideran a este fármaco más eficaz que las tetraciclinas, y lo emplean cuando existen recidivas o mala respuesta al tratamiento con éstas, si bien otros lo prefieren emplear en conjunción con esta última (Longhofer, 1988). Otros autores consideran que el imidocarb es más eficaz o al menos similar a las tetraciclinas, aunque observan que las plaquetas tardan más en normalizarse (Sainz, 2000b). Algunos autores han observado en infecciones experimentales que el imidocarb no es eficaz en estos casos (Eddlestone, 2006).

La **amicarbalida** es una diamidina aromática usada como antiprotozoario, e igualmente ha sido utilizada en el tratamiento de la ehrlichiosis, a dosis de 5-6 mg/kg, vía intramuscular, con 2 inyecciones separadas 15 días entre sí, si bien los estudios realizados al respecto son escasos (Troy, 1990).

Otra alternativa la constituyen las **quinolonas**, que poseen cierta actividad antirickettsial (Klein, 1997). La **enrofloxacin** es eficaz en el tratamiento de *R. rickettsii* en perros. Aunque en infección experimental no es capaz de eliminar *E. canis* (Neer, 1999), algunos autores consideran que podría ser eficaz en el tratamiento de estas infecciones (Kontos, 1998).

Recientemente se ha descrito el potencial terapéutico de la **rifampicina** en perros infectados experimentalmente por *E. canis*, si bien estos datos aún no han sido constatados en infecciones naturales (Schaefer, 2008).

Como **terapia de apoyo** al tratamiento farmacológico de los pacientes, se puede usar fluidoterapia y llevar a cabo una transfusión sanguínea en perros con anemia grave o aplasia de la médula ósea (Huxsoll, 1970; Neer, 1998). Cuando los valores plaquetarios están muy disminuidos, se pueden usar transfusiones de plasma rico en plaquetas.

También se emplean glucocorticoides a dosis antiinflamatorias o inmunosupresoras en los casos de trombocitopenias graves, dado que existe una destrucción inmunomediada de plaquetas asociada a la infección por estas especies (Neer, 1998; Frank, 1999). Los glucocorticoides además podrían ser útiles en artritis, vasculitis y meningitis inmunomediadas asociadas a la ehrlichiosis (Maretzki, 1994; Meinkoth, 1998; Neer, 2006) y también como tratamiento adicional para otras enfermedades inmunomediadas secundarias (Hibler, 1986).

En los casos en los que aparezcan infecciones bacterianas secundarias resistentes a las tetraciclinas, es necesaria la instauración de una antibioterapia combinada (Woody, 1991).

2.1.7 Respuesta al tratamiento y pronóstico de las ehrlichiosis y anaplasmosis

En animales que se encuentran en la fase aguda, subclínica o crónica leve, la respuesta clínica al tratamiento es muy buena y se evidencia en 24-48 horas, mejorando el apetito, actividad del animal y otros signos clínicos (Troy, 1980; Waddle, 1988; Neer, 1998; Frank, 1999; Sainz, 2000b), aunque en ocasiones la respuesta es más lenta o incompleta (Frank, 1999). Si no existe mejoría en 1-2 semanas, hay que replantear el diagnóstico, puesto que puede tratarse de otra patología, o existir infecciones o enfermedades concurrentes no diagnosticadas. Es recomendable monitorizar el valor plaquetario para valorar la respuesta al tratamiento, dado que la resolución de la trombocitopenia suele ser indicativa de una buena respuesta terapéutica (Neer, 1998). La resolución gradual de la hiperglobulinemia también sugiere una eliminación del organismo (Breitschwerdt, 1987). La médula ósea recupera su actividad en algunos días, aunque a

veces tarda más tiempo, incluso 3 meses (Hibler, 1986). Es posible la resolución clínica de la enfermedad pero con alteraciones hematológicas persistentes y con el organismo presente asimismo en la sangre (Huxsoll, 1972).

Cuanto más precoz es el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad, mejor es el pronóstico y la recuperación (Woody, 1991). En la fase crónica de la enfermedad, el pronóstico puede ser reservado (Kuehn, 1985). Los casos de muerte del animal suelen estar asociados a ciertas enfermedades concurrentes, como fallo renal, hipoplasia/aplasia medular, insuficiencia hepática, enfermedad cardíaca o neoplasia concurrente (Frank, 1999).

Es posible una resolución clínica y laboratorial de la infección, con una persistencia del título elevado de anticuerpos. El título de anticuerpos en la mayoría de los casos disminuye progresivamente tras el tratamiento (Troy, 1990), llegando a ser negativo a los 6-9 meses (Troy, 1990), aunque algunos animales mejoran clínicamente pero mantienen títulos de anticuerpos durante años (Perille, 1991; Bartsch, 1996), que puede indicar permanencia del agente en el organismo, una producción de anticuerpos persistente, una respuesta inmunitaria residual o una nueva infección (Perille, 1991; Bartsch, 1996; Frank, 1999; Sainz, 2000). También existen estudios que demuestran que cuanto más elevado es el título de anticuerpos para un agente en concreto, más tiempo tarda en volverse el título negativo después del tratamiento (Greene, 1995; Sainz, 2000b). La reinfección es posible, especialmente en zonas endémicas, dado que los animales no desarrollan inmunidad protectora tras el tratamiento (Amyx, 1971; Lewis, 1975; Breitschwerdt, 1998a). Para estos casos, algunos autores recomiendan la realización de la técnica PCR, permitiendo distinguir animales seropositivos pero sanos por un tratamiento satisfactorio, de animales en los que el tratamiento no ha sido eficaz y están aún infectados (Wen, 1997; Harrus, 1998c). Algunas limitaciones de la PCR en estos casos son, por ejemplo, que esta técnica no siempre permite diferenciar entre organismos vivos o muertos, o que si el organismo se encuentra secuestrado en algún órgano, como el bazo, no sería posible detectarlo mediante esta técnica en sangre periférica (Wen, 1997; Harrus, 1998d ; Sainz, 2000). Así pues, el Grupo de Estudio de Enfermedades Infecciosas del Colegio Americano de Medicina Interna Veterinaria (ACVIM) estipula que, si se utiliza la PCR para evaluar el tratamiento, ésta debería repetirse después de un ciclo de tratamiento; si después del tratamiento la PCR sigue siendo positiva, se recomienda dar otro ciclo más de tratamiento y repetir la PCR. Si

continúa siendo positiva tras 2 ciclos de tratamiento, recomiendan evaluar la posibilidad de usar otro fármaco. Tras un resultado negativo, se recomienda repetir la PCR a los 2 meses y si continúa siendo negativa, se considera el tratamiento como satisfactorio (Neer, 2002).

En cualquier caso, es difícil evaluar si el agente se ha eliminado completamente del organismo tras el tratamiento. En líneas generales, el Grupo de Estudio de Enfermedades Infecciosas del Colegio Americano de Medicina Interna Veterinaria (ACVIM) considera que existe una eliminación del microorganismo cuando la hiperglobulinemia y otras alteraciones clínicas y laboratoriales se resuelven progresivamente, incluso si permanece un título elevado de anticuerpos (Neer, 2002). Wen y colaboradores consideran que se ha eliminado el agente cuando se obtiene una IFI y PCR negativos tras el tratamiento, unido a la desaparición de los signos clínicos (Wen, 1997).

2.1.8 Control de las ehrlichiosis/anaplasmosis

El control de las garrapatas y el diagnóstico precoz de los animales enfermos, unido al tratamiento farmacológico oportuno, son las medidas primarias de prevención de la enfermedad.

Sería recomendable mantener un control estricto de la infestación por **garrapatas** en un área endémica (Garris, 1991). Para ello, existen diferentes medidas que se pueden tomar, como el uso de antiparasitarios externos frente a estos vectores, evitar el acceso de los animales a zonas infestadas por garrapatas e inspeccionar al animal para detectar las mismas, en especial, tras sus paseos.

Así, se puede disminuir la probabilidad de infestación por garrapatas usando **antiparasitarios externos**. Existen distintas presentaciones de éstos, y los podemos encontrar en forma de collares, sprays, pipetas o polvos, compuestos fundamentalmente por derivados organofosforados, piretroides (deltametrinas), carbamatos (carbaril y propoxur) e ivermectina (Cupp, 1991; Rodriguez, 1993; Estrada-Peña, 1994; Davoust, 2003; Otranto, 2008). Existen numerosos estudios para determinar la eficacia de estos productos comercializados en veterinaria, y parece que los collares de amitraz, el fipronil,

y la asociación de imidacloprid con permetrina (10% y 50%, respectivamente) serían efectivos en el control de infestaciones por garrapatas, sobre todo en áreas endémicas, y con ello serían útiles en la prevención de infecciones por agentes ehrlichiales (Otranto, 2008).

Habría también que **controlar el acceso** de los animales a áreas de alta densidad de garrapatas, aunque es complicado. También es recomendable **inspeccionar** a los perros para detectar la presencia de estos vectores, sobre todo cuando frecuenten zonas de riesgo, lo que ayudaría a reducir futuras infestaciones (Garris, 1991; Cupp, 1991).

Las garrapatas se adaptan muy bien al medio que rodea a los perros, encontrándose durante todo el año en perreras y lugares de descanso de los perros (Lewis, 1977). Se podrían usar **insecticidas ambientales** en estas zonas, si bien su empleo debería ser racional, para evitar desastres ecológicos o riesgos de intoxicación.

Existe un especial riesgo de infestación por garrapatas en **colectividades**, en las que además existe un mayor porcentaje de animales positivos, por lo que es necesario mantener un control del animal y de las garrapatas. Los animales introducidos por primera vez en una perrera deberían ser **analizados** serológicamente, protegidos frente a las garrapatas empleando **antiparasitarios externos** y aislados en **cuarentena** hasta la obtención de los resultados, lo que permitiría detectar posibles portadores (Pyle, 1980) y así se rompería el ciclo de estos agentes en la garrapata, dado que no existe transmisión transovárica en la misma.

Además, sería aconsejable un **diagnóstico precoz** de los enfermos y emplear **tratamientos** específicos de la forma más temprana posible, reduciéndose así el riesgo de transmisión del agente a la garrapata, y, con ello, a otros animales, así como someter a los animales a un control **serológico** regular, sobre todo en áreas endémicas (Waner, 1997).

Algunos autores señalan la posibilidad de un tratamiento **profiláctico** con tetraciclinas para evitar una primoinfección o reinfección (Davoust, 2003), sobre todo en zonas endémicas, pero se corre el riesgo de resistencia antibiótica del organismo y es un tema controvertido (Neer, 1998; Goodman, 1999).

Como se pueden transmitir estos agentes por medio de **transfusión** sanguínea, habría que descartar la infección del animal donante por estos agentes, realizandose 2 tests serológicos separados un mes entre sí, debiendo ser negativos a ellos (Woody, 1991).

En el caso de *N. risticii*, se debería evitar el acceso de los animales a **aguas estancadas** para disminuir la probabilidad de exposición a los vectores.

Aún no existe una **vacuna** eficaz para prevenir la mayoría de estas infecciones (Woody, 1991; Neer 1998), si bien se han desarrollado vacunas frente a *N. risticii* y *E. ruminantium* (Palmer, 1989; Martinez, 1994).

2.1.9 Consideraciones de salud pública

No existe evidencia de transmisión directa de estas enfermedades de los perros o gatos a las personas (Neer, 2002); sin embargo, dado que las mascotas son susceptibles de infectarse por los mismos organismos que afectan a humanos, los animales potencialmente pueden actuar como reservorios de estos agentes y pueden acercar los vectores al hombre (Ristic, 1972; Groves, 1975; Neer, 2002).

2.1.10 Ehrlichiosis, anaplasmosis y neorickettsiosis en la especie felina

Como hemos venido señalando, miembros de la familia *Rickettsiaceae* pueden producir enfermedad en muchas especies animales, como perros, caballos, rumiantes, roedores y el hombre (Rikihisa, 1991; Neer, 1998).

El gato parece estar menos predispuesto que el perro a las enfermedades transmitidas por garrapatas, entre ellas la ehrlichiosis, aunque al compartir en muchos casos el mismo hábitat, se espera que las infecciones que se producen en gato sean producidas por los mismos agentes que en el perro (Tabar, 2008).

Las ehrlichiosis, anaplasmosis y neorickettsiosis son enfermedades diagnosticadas con poca frecuencia en la especie felina, comparado con otras enfermedades del gato, lo que puede ser debido a un bajo reconocimiento de las enfermedades transmitidas por garrapatas en gatos, una menor patogenicidad de estas infecciones en esta especie, una resistencia inmunitaria innata o una adaptación a la infección (Shaw, 2001c). Otras posibles causas son la mayor facilidad de eliminar las garrapatas por el acicalado, no dando oportunidad a la transmisión de la infección, (Breitschwerdt, 2003) o una diferente interacción con el vector (Eberhardt, 2006). A pesar de todo ello, han sido descritos en la literatura más de 50 casos de ehrlichiosis y anaplasmosis felinas.

El primer caso de infección natural por *Ehrlichia* en el gato tuvo lugar en 1986 en Francia (Charpentier, 1986). Desde entonces, se han descrito numerosos casos no sólo en Francia (Charpentier, 1986; Beaufls, 1995, 1997), sino en otros países, como Italia (Tarello, 2005), Kenia (Buoro, 1989), Suecia (Bjöersdorf, 1999), Tailandia (Jittapalapong, 1993), Brasil (Almosny, 1999) y Estados Unidos (Bouloy, 1994).

2.1.10.1 Etiología y epidemiología

Existe evidencia de infección en el gato tanto por especies monocíticas de *Ehrlichia* como granulocíticas, si bien parece que las formas granulocíticas están menos documentadas que las primeras.

En este sentido, la especie *A. phagocytophilum*, que engloba a las antiguas especies *E. equi*, *A. phagocytophila* y HGE, es capaz de infectar experimentalmente al gato (Lewis, 1975; Foley, 2003). Además, se ha demostrado la existencia de infección natural por este agente en el gato mediante técnicas moleculares (Bjöersdorff, 1999; Lappin, 2004; Shaw, 2005). Asimismo, se han detectado cuerpos de inclusión compatibles con *A. phagocytophilum* en neutrófilos (Tarello, 2005), así como reacción serológica frente a este agente (Bjöersdorff, 1999; Lappin, 2004; Magnarelli, 2005; Solano-Gallego, 2006b; Billeter, 2007). Esta especie produce la, llamada por algunos, ehrlichiosis granulocítica felina (FGE) (Tarello, 2005).

Hasta el momento no ha sido posible la infección experimental del gato con *E. canis* (Lappin, 2004) y algunos autores postulan que este agente no es patógeno en esta especie (Troy, 1990; Kordick, 1995), si bien un organismo muy similar a *E. canis* ha sido detectado molecularmente en gatos infectados naturalmente (Breitschwerdt, 2002, 2003; Beaufils, 2002). Además, diversos estudios serológicos han encontrado seroreactividad frente a este agente en el gato (Bouloy, 1994; Matthewman, 1996; Stubbs, 2000; Aguirre, 2004A; Ortuño, 2005; Vita, 2005; Solano-Gallego, 2006b), por lo que esta aún por aclarar su papel en la especie felina.

Estudios experimentales también han demostrado la posibilidad de infección en gatos por el agente *N. risticii* (antiguamente denominada *E. risticii*), produciendo signos clínicos y un aumento del título de anticuerpos frente al agente, y siendo posible, además, su aislamiento en cultivos celulares, lo que demuestra la susceptibilidad del gato a infectarse (Dawson, 1988). Otros estudios serológicos respaldan la posibilidad de infección por este agente, mostrándose resultados serológicos positivos en gatos de distintos países (Bouloy, 1994; Peavy, 1997; Stubbs, 2000; Aguirre, 2004a).

No obstante, en líneas generales, se han realizado diversos intentos para amplificar ADN de *Ehrlichia* spp., *Neorickettsia* spp., y *Anaplasma* spp. en zonas endémicas para estos agentes y en gatos callejeros con resultados insatisfactorios (Luria, 2004; Eberhardt, 2006).

En cuanto a las tasas de seroprevalencia encontradas en distintos países, son muy variables, detectándose valores desde el 1% hasta el 82,4% para *E. canis* (Bouloy, 1994; Matthewmann, 1996; Boni, 1997; Stubbs, 2000; Aguirre, 2004a; Vita, 2005; Ortuño, 2005; Solano-Gallego, 2006b), del 1,8% hasta el 38% para *A. phagocytophilum* (Aguirre, 2004a; Magnarelli, 2005; Solano-Gallego, 2006b; Billeter, 2007) y desde el 2,4% hasta el 52,9% para *N. risticii* (Perry, 1989; Bouloy, 1994, Aguirre, 2004a).

Ninguna publicación ha descrito hasta ahora el modo de transmisión de estos agentes en el gato. Por un lado, se han implicado a las **garrapatas**, dado que son conocidos vectores de estos agentes en la especie canina, lo que hace suponer que se transmitan al gato por la picadura de la misma. Además se han detectado garrapatas en gatos con

mórulas compatibles con *Ehrlichia/Anaplasma* spp. (Buoro, 1989; Bjöersdorf, 1999; Tarello, 2005). Sin embargo, existen casos descritos como presuntas ehrlichiosis felinas en los que no existía exposición a vectores artrópodos (Charpentier, 1986; Bouloy, 1994; Beaufils, 1995, 1997; Peavy, 1997).

Por otro lado, se ha vinculado su transmisión a las **pulgas**, por estar presentes estos vectores en gatos sospechosos de infección por *Ehrlichia* spp. (Peauvy, 1997).

Otra posibilidad sería la adquisición de estos agentes mediante la ingestión de roedores infectados, como ocurre en el caso de *Coxiella burnetii* (Kordick, 1995) o por contacto con artrópodos que se alimentan de los **roedores** (Kawahara, 1993; Nicholson, 1998).

Aunque no parece que exista ningún informe sobre la transmisión de *Ehrlichia* spp. en gatos a través de **transfusión** sanguínea, estas infecciones podrían transmitirse de un gato a otro por esta vía, al igual que sucede en el perro, por lo que algunos autores sugieren la necesidad de descartar estos agentes en gatos donantes (Stubbs, 2000).

Dada la evidencia de exposición natural a estas especies en el gato, en función de los resultados serológicos obtenidos, se sugiere el papel del gato como fuente de infección para otras especies animales, actuando como un hospedador intermediario (Dawson, 1988).

Algunos autores consideran que los gatos **callejeros** tienen más predisposición a contraer estas enfermedades, dada la mayor facilidad de exposición a los potenciales vectores, su falta de protección frente a ellos y el contacto con otros animales callejeros (Nutter, 2004; Eberhardt, 2006). Sin embargo, existen estudios que afirman que los gatos callejeros no parecen estar más expuestos a estos agentes ni suponen un mayor riesgo para el contagio a humanos u otros gatos que los domésticos (Luria, 2004; Case, 2006), lo que está respaldado, además, por la descripción de casos infectados por *A. phagocytophilum*, fundamentalmente en gatos domésticos (Lappin, 2004).

Son varios los estudios que buscan **asociaciones** entre seropositividad y una serie de factores de riesgo en relación con el animal y su entorno, que puedan influir en la presentación de enfermedad. Algunos autores **no** encuentran asociaciones entre las

características del animal (raza, sexo, edad, distribución geográfica o área de residencia) y los signos clínicos o laboratoriales característicos de estas infecciones, con el padecimiento de esta enfermedad en gatos (Beaufils, 1997; Shaw, 2005; Magnarelli, 2005). No obstante, los resultados al respecto son diversos. Así, en un estudio en el que la mayoría de los gatos positivos a *Ehrlichia* estaban **castrados**, se sugiere que estos animales podrían estar más controlados que los que no son sometidos a cirugía y, por tanto, sería más probable su control serológico, siendo así estas infecciones más fácilmente detectadas (Beaufils, 1997). Otros encuentran que los gatos menores de 5 **años** tienen más probabilidad de ser afectados, lo que podría ser debido a una mayor actividad e intrepidez debida a su edad (Tabar, 2008). La **salida** al exterior de la vivienda parece asociada a presentar estas infecciones, lo que respaldaría la hipótesis de una transmisión vectorial (Stubbs, 2000). Algunos autores indican que sí existe una relación entre la infección por estos organismos y la presentación de **signos clínicos** (Lappin, 2004), mientras otros encuentran asociación entre animales **sanos** y seropositividad a *E. canis* (Solano-Gallego, 2006b). Stubbs y colaboradores consideran a las **hembras** más predispuestas (Stubbs, 2000).

2.1.10.2 Patogenia

La patogenia de esta enfermedad en gatos es aún desconocida. Si nos basamos en los signos clínicos y hallazgos laboratoriales encontrados en la especie felina, la patogenia de esta enfermedad podría ser similar a la de la infección en perros.

Como ocurre en el caso del perro, un estado inmunitario deficitario podría favorecer el desarrollo de una ehrlichiosis en el gato (Beaufils, 1995). De hecho, algunos autores consideran que son enfermedades oportunistas y que si se diagnostican, debe buscarse otra enfermedad concurrente, sobre todo en aquellos casos en los que no se produce una mejoría tras la instauración de un tratamiento apropiado para la ehrlichiosis (Beaufils, 1997).

En este sentido, es posible detectar en el gato la **coinfección** con otros agentes, como ocurre en el perro (Magnarelli, 2005). Se han descrito casos de concurrencias con infección por *Hemobartonella felis* (Lappin, 2003b), *B. burgdorferi* (Magnarelli, 2005),

Leishmania spp. (Vita, 2005) y con otras enfermedades graves como el linfosarcoma (Lappin, 2003b).

La presencia de virus inmunosupresores, como la leucemia o inmunodeficiencia felinas (**FeLV** o **FIV**), parece no presentar asociación con el padecimiento de estas enfermedades, y así, no parece aumentar la gravedad de las mismas, si bien puede atenuar la respuesta inmunitaria del animal frente al patógeno, facilitando posiblemente la infección por estos agentes (Stubbs, 2000; Foley, 2003).

2.1.10.3 Signos clínicos de la ehrlichiosis felina

Se han descrito multitud de signos clínicos de ehrlichiosis en el gato, muchos de ellos, como en el caso de las ehrlichiosis caninas, de tipo inespecífico.

La **fiebre** es el signo más común encontrado en todos ellos. Algunos síntomas descritos por diversos autores en casos de ehrlichiosis felina natural o experimental son: anorexia, pérdida de peso, depresión, letargia, mucosas pálidas, hemorragias petequiales, cambios de comportamiento, pobre condición del pelo, vómitos y diarreas, dolor articular, linfadenomegalia, espleomegalia, disnea, secreción ocular, conjuntivitis, desprendimiento de retina, ceguera y, con menor frecuencia, deshidratación, gingivitis, periodontitis, faringitis, hematuria, polidipsia y poliuria, taquipnea y problemas neurológicos como temblores e incoordinación (Charpentier, 1986; Buoro, 1989; Bouloy, 1994; Beaufile, 1995, 1997; Stubbs, 1998, 2000; Bjöersdorff, 1999; Breitschwerdt, 2002; Aguirre, 2004a; Lappin, 2004; Tarello, 2005; Ortuño, 2005; Vita, 2005; Magnarelli, 2005). La anorexia suele ser el último signo en desaparecer (Beaufils, 1997)

2.1.10.4 Hallazgos laboratoriales de la ehrlichiosis felina

El hallazgo laboratorial más común en el curso de la ehrlichiosis en gato es la **anemia**, normalmente no regenerativa, normocítica y normocrómica, aunque también

puede ser regenerativa (Charpentier, 1986, Buoro, 1989; Bouloy, 1994; Beaufils, 1995, 1997, 1999, Stubbs, 2000; Breitschwerdt, 2002, Aguirre, 2004a).

También es posible encontrar **trombocitopenia**, **leucocitosis** o **leucopenia**, e **hiperproteinemia**, con hiperglobulinemia (Buoro, 1989; Bouloy, 1994; Beaufils, 1995, 1997, 1999; Stubbs, 1998, 2000; Bjöersdorff, 1999; Breitschwerdt, 2002; Foley, 2003; Aguirre, 2004a).

Otras alteraciones descritas son: el aumento de los valores de urea y creatinina, aumento en el valor de las enzimas hepáticas, hipercolesterolemia, hiperbilirrubinemia, hipoalbuminemia, hipokalemia e hiperglicemia (Bouloy, 1994; Stubbs, 1998, 2000; Bjöersdorff, 1999; Foley, 2003; Aguirre, 2004a). La hiperglicemia probablemente no esté asociada a la ehrlichiosis y esté más asociada al estrés, dado que no se ha observado en perros con ehrlichiosis (Bjöersdorff, 1999).

También se han detectado anticuerpos antinucleares (**ANA's**) en sueros de gatos infectados por estos agentes (Breitschwerdt, 2002).

2.1.10.5 Diagnóstico

Un diagnóstico presuntivo de ehrlichiosis lo daría la conjunción de diversos factores, al igual que sucede en el caso del perro, como la detección de mórulas en frotis sanguíneos o aspirados de tejidos como el bazo, médula ósea o los linfonódulos, la presentación de signos clínicos compatibles con ehrlichiosis, la presencia de un título elevado de anticuerpos, la respuesta a un tratamiento eficaz y la ausencia de otra enfermedad concurrente (Bouloy, 1994; Peavy, 1997; Beaufils, 1997; Bjöersdorff, 1999; Tarello, 2005). Más recientemente, se están incluyendo las técnicas moleculares para el diagnóstico de estas enfermedades en gatos.

La detección de **cuerpos de inclusión** intracitoplasmáticos compatibles con *Ehrlichia/Anaplasma* spp. en frotis sanguíneos nos daría un diagnóstico de la enfermedad (Stubbs, 2000, Tarello, 2005). Sin embargo, y como hemos mencionado con anterioridad,

la detección de mórulas es más frecuente en fases agudas de la enfermedad; por tanto, no es fácil el diagnóstico por esta vía, si bien en algunos artículos se demuestra que la presencia del agente en glóbulos blancos puede ser muy elevada, incluso llegando al 21% de leucocitos infectados (Tarello, 2005), dato comparable con el 3-34% de infección encontrado en perros (Egenvall, 1998). También es posible realizar frotis a partir de aspirados o improntas de linfonódulos u otros tejidos (Bouloy, 1994), como hemos mencionado.

Se ha intentado el **cultivo** *in vitro* de estos agentes (Buoro, 1989, Dawson, 1988), usando métodos similares a los usados en las ehrlichiosis caninas, si bien aún no ha sido posible su aislamiento en la especie felina (Breitschwerdt, 2002, 2003; Ayllón, 2008).

El uso de **técnicas serológicas**, como la IFI (Bouloy, 1994; Peavy, 1997; Beaufile, 1997; Bjöersdorff, 1999), el Western blot (Matthewman, 1996; Peavy, 1997) y el ELISA está muy extendido, aunque es necesario combinarlas con otras técnicas diagnósticas, dado que un resultado negativo no excluye la infección, e igualmente no todos los animales seropositivos padecen síntomas clínicos de enfermedad; por tanto, y al igual que referíamos para el caso del perro, la serología debería interpretarse junto con otros datos (Bouloy, 1994; Madigan, 1995).

Así, diversos estudios serológicos muestran la existencia de anticuerpos frente a agentes monocíticos, como *E. canis* y *N. risticii* y, más recientemente, granulocíticos, en concreto *A. phagocytophilum*, en sueros de gato (Bouloy, 1994; Beaufile, 1995; Matthewman, 1996; Peavy, 1997; Bjöersdorff, 1999; Stubbs, 2000; Aguirre, 2004a; Lappin, 2004; Magnarelli, 2005; Ortuño, 2005; Vita, 2005; Solano-Gallego, 2006b; Billeter, 2007). Algunos autores señalan que los gatos de una zona concreta tienen con mayor probabilidad títulos elevados frente a *E. canis* que frente a *N. risticii*, y cuando se analizan los dos agentes, el título de *E. canis* es mayor que el de *N. risticii* (Bouloy, 1994). En otros estudios, cuando se evalúan los dos agentes, existe seropositividad sólo frente a *N. risticii* en algunos casos, lo que puede ser debido a la infección por agentes ehrlichiales diferentes, variaciones en su antigenicidad en diferentes áreas geográficas, o variaciones en la respuesta inmunitaria frente al mismo organismo según la fase de enfermedad (Peavy, 1997).

Un resultado serológico aislado, sin la presencia de signos clínicos compatibles con ehrlichiosis sería sólo sugerente de infección previa (Bjöersdorff, 1999), dado que se han visto resultados serológicos positivos tanto en animales clínicamente sanos como enfermos.

Como hemos mencionado en el caso de estas enfermedades en el perro, existe **reacción cruzada** entre *E. canis* y *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *E. ewingii*, *N. helminthoeca* y, débilmente, con *A. phagocytophilum* (Ristic, 1981, 1986; Rikihisa, 1991, Shankarappa, 1992, Dawson, 1992, Bouloy, 1994, Neer, 2006). Dado que algunos autores hipotetizan que *E. canis* no infecta al gato, es posible que otras especies ehrlichiales, relacionadas con *E. canis*, lo infecten, produciendo signos clínicos de enfermedad (Bouloy, 1994). De hecho, Stubbs y colaboradores postulan que en los animales seropositivos a *E. canis*, la infección está realmente producida por otra especie de *Ehrlichia* distinta (Stubbs, 2000).

Un resultado serológico negativo, pero con presencia de inclusiones sospechosas de *Ehrlichia* spp., podría ser debido, por un lado, a la presencia de otros gránulos similares pero no patognomónicos de *Ehrlichia*, o bien porque nos encontramos en una fase temprana de enfermedad y no ha habido tiempo para que se produzca una seroconversión (Beaufils, 1997).

Las **técnicas moleculares**, como la PCR, podrían ayudar a definir el estado de infección y han sido usadas recientemente en el diagnóstico de las enfermedades transmitidas por vectores en gatos y, en concreto, en el diagnóstico de las ehrlichiosis (Bjöersdorff, 1999; Breitschwerdt, 2002; Lappin, 2004, Shaw, 2005, Tabar, 2008). La elevada sensibilidad y especificidad, particularmente en fases tempranas de enfermedad, son algunas de las ventajas que proporciona esta técnica. Sin embargo, algunos problemas derivados de la misma serían que, aunque la presencia de ADN del microorganismo teóricamente indica infección activa, la técnica no es diagnóstica de enfermedad por sí sola, sino que tiene que ir acompañada de signos clínicos compatibles.

El ADN de un agente muy próximo a *E. canis* ha sido amplificado por primera vez en gatos por Breitschwerdt y colaboradores (Breitschwerdt, 2002), aunque serológicamente los animales resultaron negativos a este agente. También se encuentran depositadas en

GenBank secuencias de *E. canis* procedentes de gatos de Taiwan (nº acceso: EU139493). Bjöersdorff y colaboradores igualmente amplificaron ADN de la antiguamente denominada *E. equi* en Suecia (Bjöersdorff, 1999). *A. phagocytophilum* también ha sido detectada molecularmente en un gato en Reino Unido (Shaw, 2005) y en Estados Unidos (Lappin, 2004).

2.1.10.6 Diagnóstico diferencial

Debido a los elevados valores de seroprevalencia que se describen en algunas áreas, la ehrlichiosis se debería incluir en la lista de diagnósticos diferenciales en gatos, especialmente en aquellos con síntomas compatibles con ehrlichiosis (Stubbs, 2000). Algunos autores señalan que se debería realizar una prueba serológica en los gatos FeLV/FIV negativos, que presenten anorexia, abatimiento, pérdida de peso, hipertermia y/o dolores, hiperproteinemia, trombocitopenia y cuerpos de inclusión en leucocitos (Beaufils, 1997).

Se han visto casos de coinfección con *Leishmania* spp. (Vita, 2005), así como con *B. burgdorferi* (Magnarelli, 2005).

2.1.10.7 Tratamiento

Para el tratamiento de estas infecciones se usan, al igual que en el perro, tetraciclinas, como la doxiciclina, y dipropionato de imidocarb.

Las **tetraciclinas** han sido empleadas con buenos resultados en Kenia (Buoro, 1989). También se ha usado la **doxiciclina** vía oral en gatos sospechosos de ehrlichiosis a dosis de 5-10 mg/kg 2 veces al día durante 21 días, con resultados satisfactorios (Bouloy, 1994; Peavy, 1997; Beaufils, 1997; Bjöersdorff, 1999; Lappin, 2004; Tarello, 2005), aunque en algunos casos, a pesar de resolverse los signos clínicos, permanece elevado el título de anticuerpos (Bjöersdorff, 1999). El Grupo de Estudio de Enfermedades Infecciosas del Colegio Americano de Medicina Interna Veterinaria (ACVIM) recomienda

una dosis de doxiciclina de 10 mg/kg diariamente durante 28 días (Neer, 2002). En ocasiones es necesario repetir ciclos de tratamiento con doxiciclina para la eliminación completa de los signos clínicos, laboratoriales y la seropositividad (Peavy, 1997, Beaufils, 1997).

También ha demostrado ser eficaz en algunos casos el **dipropionato de imidocarb**, vía intramuscular (Buoro, 1989), y en algunos casos se ha usado también la **enrofloxacina** (Beaufils, 1997).

Asímismo podría usarse una **terapia de apoyo** similar a la descrita para el caso de las ehrlichiosis caninas. Sin embargo, se ha visto que los corticoesteroides podrían interferir en la eficacia de la doxiciclina cuando se usan conjuntamente en el gato, por lo que sería recomendable tratar únicamente con doxiciclina estos casos (Breitschwerdt, 2003).

2.1.10.8 Respuesta al tratamiento

Al igual que ocurre en la especie canina, en general, la respuesta al tratamiento es satisfactoria cuando el diagnóstico es precoz. Igualmente la erradicación completa es difícil (Bjöersdorff, 1999), por lo que los tratamientos se pueden alargar en el tiempo, incluso llegando a los 40 días (Tarello, 2002a, 2005). En este sentido, estas infecciones persistentes pueden presentarse en animales inmunodeprimidos, en los que se favorecen la aparición de infecciones secundarias (Tarello, 2002a, 2002b).

Hasta la fecha, se desconoce el tiempo de persistencia de anticuerpos elevados en sangre en gatos, si bien cabe esperar que la disminución del título de anticuerpos se produzca progresivamente con el tiempo, como ocurre en la especie canina. Un tiempo prolongado de descenso del título podría estar relacionado con la incompleta eliminación del agente tras el tratamiento (Peavy, 1997). De cualquier modo, aún no se conoce si los gatos pueden quedar infectados persistentemente o si poseen una respuesta inmunitaria residual en las fases crónicas de la enfermedad (Shaw, 2001c).

2.1.10.9 Consideraciones para la salud pública

El gato podría constituir un reservorio de estas enfermedades para el hombre y a la vez padecer la enfermedad. De hecho, en algunos casos, el agente ehrlichial detectado en gatos es idéntico al encontrado en el hombre que convive con el gato (Bjöersdorff, 1999). *E. chaffeensis*, que produce enfermedad en personas, posee reacción cruzada con *E. canis*, como hemos mencionado anteriormente y, dado que se hipotetiza que *E. canis* no infecta al gato, es posible que los casos seropositivos a este último agente sean debidos a *E. chaffeensis*, con el consiguiente riesgo potencial para el hombre (Stubbs, 2000).

De cualquier modo hasta el momento no hay ningún estudio que muestre que la convivencia con gatos sea un factor de riesgo para la infección por estas especies en el hombre.

2.1.11 Situación de la ehrlichiosis en España

Tanto *E. canis* como *A. platys* y *A. phagocytophilum* han sido descritos en Europa. Así, se ha demostrado la presencia de ***E. canis*** en perros en Italia (Buonavoglia, 1995), Portugal (Bacellar, 1995), Grecia (Mylonakis, 2003), Francia (Cabassu, 1980; Davoust, 1998), Alemania (Gothe, 1998), Países Bajos (Zandvliet, 2004) y España (Sainz, 1995; Varela, 1997; Aguirre, 2004b). También se han descrito casos importados en Inglaterra (Gould, 2000) y Suiza (Pusterla, 1998).

Se han descrito asimismo especies granulocíticas, actualmente englobadas como ***A. phagocytophilum***, en perros en Italia (Alberti, 2006), Grecia (Mylonakis, 2004), Suecia (Engenvall, 1998), Reino Unido (Shaw, 2001b), Eslovenia (Strasek, 2008) y Escocia (Alberdi, 1998).

A. platys también se ha descrito en perros en Francia (Beaufils, 2002), Grecia (Kontos, 1991; Mylonakis, 2004), Italia (Alberti, 2006), España (Sainz, 1999) y en un caso importado en Alemania (Glaser, 1998).

En la geografía española se pueden encontrar múltiples especies de garrapatas, entre ellas ejemplares de los géneros *Rhipicephalus* (*R. sanguineus*, *R. turanicus*, *R. bursa* y *R. pusillus*) e *Ixodes* (*I. ricinus*, *I. hexagonus* e *I. canisuga*) (Estrada-Peña, 1994, 1995). Las especies de *Rhipicephalus* están asociadas a lugares secos, en general en formaciones esteparias de tipo mediterráneo, y presentan una curva bimodal de actividad, presentando un pico de actividad en primavera y otro de nuevo en otoño (Arthur, 1956; Estrada-Peña, 1994; Herrero, 1994). Las especies del género *Ixodes* se encuentran en zonas húmedas de tipo bosque atlántico y suele ser activas especialmente en otoño, aunque en algunas zonas pueden serlo en el resto de estaciones del año (Estrada-Peña, 1994).

E. canis ha sido descrito como el agente etiológico responsable de la ehrlichiosis canina en España y está extendido en la práctica totalidad del territorio nacional, debido posiblemente a que su vector, la garrapata *R. sanguineus*, es la garrapata más ubicua y frecuente en perros en España (Cordero del Campillo, 1980; Herrero, 1992; Olmeda, 1993; Estrada-Peña, 1995; Prieto, 1999).

La primera descripción de ehrlichiosis canina en España tuvo lugar en el norte del país, en Cataluña, en 1988 (Font, 1988). Desde entonces, se han descrito casos en casi todas las comunidades del país, incluidas las islas Baleares y Canarias, con valores de seroprevalencia variables en las distintas regiones (Sainz, 1996a, 1998; González, 2000; Amusategui, 2008). Sin embargo, no fue hasta el año 2004 en el que se aisló, cultivó e identificó genéticamente *E. canis* en España (Aguirre, 2004b).

En nuestro país, algunos factores, como el lugar de residencia del animal, parecen influir en la presentación de esta infección, encontrándose una mayor prevalencia de la misma en áreas rurales, posiblemente por un mayor contacto con las garrapatas (Sainz, 1995; Tesouro, 2001). Asimismo, los perros de caza con infestación masiva de garrapatas tienen una mayor prevalencia de infección que perros con control profiláctico exhaustivo frente a las mismas (Sainz, 1995). Además, los perros procedentes de perreras parecen estar más expuestos que los de clínicas (Amusategui, 2008).

En España también se han descrito perros seropositivos y con inclusiones en plaquetas compatibles con *A. platys* (Sainz, 1999); recientemente este mismo agente se ha

caracterizado molecularmente a partir de un perro infectado en la Comunidad de Madrid (Aguirre, 2006).

Estudios de seroprevalencia muestran seroreactividad frente a *A. phagocytophilum* y *N. risticii* en perros en España (Sainz, 2000a; Solano-Gallego, 2006a; Amusatogui, 2008). En el noroeste del país, los porcentajes de seropositividad frente a *A. phagocytophilum* son incluso mayores que frente a *E. canis* (Amusatogui, 2008). Sin embargo, debido a la existencia de reacciones serológicas cruzadas entre algunos de estos agentes, es posible que la infección esté producida por algún agente diferente al analizado, por lo que sería necesario usar técnicas diagnósticas más específicas.

Se han observado concurrencias de ehrlichiosis con otras infecciones en España, sobre todo con leishmaniosis (Tesouro, 1993; Sainz, 1996b; Guillén, 2002).

Con respecto al **gato**, estudios previos señalan la presencia de múltiples microorganismos en este animal en España, como *R. felis*, hemoplasmas (*Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum*), *Babesia* spp., *Theileria* spp., *L. infantum*, *E. canis*, *A. phagocytophilum*, *B. henselae*, y *B. claridgeae* (Marquez, 2002; Criado-Fornelio, 2003; Ortuño, 2005; Pons, 2005; Solano-Gallego, 2006b; Martín-Sanchez, 2007).

Distintos estudios serológicos han demostrado la presencia de anticuerpos frente a *E. canis*, *N. risticii* y *A. phagocytophilum* en gatos en España, encontrándose valores de seroprevalencia que varían desde el 10,6% al 17,9% para *E. canis* (Aguirre, 2004a; Ortuño, 2005; Solano-Gallego, 2006b), del 1,8% al 4,9% para *A. phagocytophilum* (Aguirre, 2004a; Solano-Gallego, 2006b) y del 2,4% para *N. risticii* (Aguirre, 2004a). Los diferentes valores de seroprevalencia en distintas zonas de España podrían explicarse por la diferente distribución de los vectores o por la diferente muestra poblacional (Tabar, 2008).

Recientemente, un gato en Barcelona ha resultado positivo mediante PCR a *Ehrlichia/Anaplasma* spp., si bien no existe secuenciación de dicha amplificación (Tabar, 2008).

En cuanto a la ehrlichiosis **humana** en España, el primer caso fue descrito en el año 2000 por Oteo y colaboradores, producido por el agente de la *ehrlichiosis granulocítica*

humana (EGH) (actualmente considerado *A. phagocytophilum*) (Oteo, 2000). Este agente ha sido descrito en distintos animales de nuestro entorno, como en ciervos, ganado, pájaros, así como en garrapatas (Oteo, 2001; de la Fuente, 2005, García, 2006), existiendo también estudios serológicos de evidencia de contacto de personas con este agente (Oteo, 2001). La primera evidencia de infección activa, demostrada por métodos moleculares, de este agente en España se produjo en el año 2006 (García, 2006). Recientemente ha sido descrito otro caso probable de anaplasmosis humana en Alicante (Peris-García, 2007).

2.2 LEISHMANIOSIS

2.2.1 Introducción a la leishmaniosis

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria de distribución mundial, causada por protozoos intracelulares obligados del género *Leishmania* (phylum *Protozoa*, subphylum *Sarcomastigophora*, superclase *Mastigophora*, clase *Zoomastigophora*, orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae*, suborden *Trypanosomatina*) y que parasitan tanto al hombre como a los animales.

La enfermedad fue nombrada como tal en 1901, en honor al patólogo William Boog Leishman. En 1903 Leishman y Donovan describen separadamente el protozoo hoy llamado *Leishmania donovani* en pacientes humanos en India (Leishman, 1903; Donovan, 1903).

La leishmaniosis se considera endémica en 88 países, 66 de ellos pertenecientes al Viejo Mundo y 22 al Nuevo Mundo (WHO, 2004). Más de 350 millones de personas se encuentran en estado de riesgo; según las estimaciones, hay 14 millones de personas que se encuentran infectadas y cada año se registran aproximadamente 2 millones de casos nuevos de leishmaniosis (Desjeux, 1996; OMS, 1990, 2000, 2006). La mayoría de las leishmaniosis son zoonosis y muchos de sus signos clínicos y lesiones observadas en animales son similares a los encontrados en medicina humana (Keenan, 1984). En la actualidad se detecta cada vez con mayor frecuencia en personas inmunodeprimidas, sobre todo por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Alvar, 1997). Hoy en día la leishmaniosis es importante no sólo por su papel zoonótico, sino también en medicina veterinaria debido a que el perro doméstico es su principal reservorio (OMS, 1990).

Se conocen unas 30 especies de *Leishmania* de las que aproximadamente 20 pueden causar enfermedad en el hombre (Ashford, 2000). Lainson y Shaw dividieron el género *Leishmania* en dos subgéneros, *Leishmania* (L.) y *Viannia* (V.), implicados en la

etiología de las leishmaniosis humanas (Lainson, 1987). La identificación de las especies ha estado clásicamente basada en el cuadro clínico provocado, su distribución geográfica y el comportamiento del parásito en el vector (Gallego, 2004). Una posterior clasificación utiliza otros criterios como las técnicas moleculares, el análisis electroforético de isoenzimas, y la reactividad a anticuerpos monoclonales y antígenos de membrana (Baneth, 2006). La aplicación de la electroforesis de isoenzimas al estudio de las leishmaniosis ha permitido efectuar diversas clasificaciones (Rioux, 1990; Thomaz-Soccol, 1993a, 1993b) agrupando las especies en unidades taxonómicas llamadas zimodemes. Así, el subgénero *Leishmania* incluye nueve complejos en el Viejo Mundo (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. tropica*, *L. killicki*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. turanica*, *L. gerbilli* y *L. arabica*), y cuatro en el Nuevo Mundo (*L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. enrietti* y *L. hertigi*). En el subgénero *Viannia* del Nuevo Mundo se incluyen cuatro complejos: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, y *L. (V.) lainsoni*.

La parasitosis se transmite por la picadura de ciertos insectos, en concreto *Phlebotomus* en el Viejo Mundo (Mediterráneo, Medio Oriente, África e India) y *Lutzomya* en el Nuevo Mundo (América Central y del Sur), ambos pertenecientes a la Familia *Psychodidae* (OMS, 1990; Desjeux, 1996). Existen numerosas especies de flebotomos, pero sólo unos pocos actúan como transmisores de enfermedades. Aproximadamente 30 especies de estos flebotomos son considerados vectores. La transmisión del agente se lleva a cabo por la hembra del flebotomo, dado que únicamente ella tiene actividad hematófaga (Franc, 1993; Molina, 1995). Estos vectores son insectos de pequeño tamaño (2-3 mm de longitud) que tienen actividad crepuscular y nocturna, alimentándose normalmente de su hospedador cuando éste está dormido (Arias, 1996). Habitan en zonas tropicales y templadas, y son activos principalmente en los meses cálidos que van de primavera a otoño (Killick-Kendrick, 1990), aunque también se pueden encontrar en otros períodos fuera de este rango, dependiendo principalmente de las condiciones climatológicas (Rossi, 2008). Se mueven en distancias cortas, y además se han encontrado en distintas áreas geográficas, lo que podría explicar por qué existen áreas de elevada prevalencia de presentación de enfermedad junto a otras de muy baja prevalencia (Mancianti, 1986).

Se ha propuesto a otros vectores hematófagos, como las garrapatas o pulgas, como potenciales transmisores de *Leishmania* spp., si bien ello sólo se ha constatado experimentalmente (Coutinho, 2005, 2007).

La transmisión de este parásito, aunque más raramente, también se puede llevar a cabo en el hombre por vía endovenosa, a través de jeringas que actuarían como vehículo de las células parasitadas (Jiménez, 1995; Alvar, 1997), o bien por vía venérea (Symmers, 1960), por accidente laboral (Terry, 1950), por contacto directo con lesiones cutáneas (Harris, 1994), por infección transplacentaria (Rosypal, 2005) o por transfusión de sangre (Freitas, 1997; Riera, 2008).

En el **ciclo** natural de transmisión de *Leishmania* spp. intervienen un vector, en este caso el flebotomo, y un hospedador vertebrado. En su ciclo evolutivo se alternan una fase intracelular, en el hospedador vertebrado, en la que el parásito se presenta en forma no flagelada (amastigote), y otra extracelular en el vector, presentándose en forma flagelada (promastigote) (Schmidt, 1985). Los **amastigotes** poseen forma oval o redondeada, con un diámetro que oscila entre las 2 y 5 μm (Zuckerman, 1977). Poseen un núcleo grande basófilo, una estructura mitocondrial especializada en forma de barra (kinetoplasto) y un flagelo rudimentario (Rodríguez, 1984; Pearson, 1996). Los **promastigotes** son fusiformes, poseen un flagelo rostral que les permite el movimiento, un kinetoplasto transversal al eje del flagelo externo y un núcleo central (Rodríguez, 1984).

En cuanto al ciclo biológico, cuando el vector se alimenta de la sangre (que porta el parásito) del hospedador vertebrado, inyecta a través de la saliva el agente en forma de promastigote. Los promastigotes en el hospedador vertebrado son fagocitados por los macrófagos, pierden el flagelo y se transforman en la forma no flagelada o amastigote. Los amastigotes se multiplican por fisión binaria, rompen la membrana del macrófago e infectan nuevas células, pudiendo extenderse por los diferentes tejidos a través de sangre y linfa. Cuando el vector se alimenta del hospedador, ingiere las células parasitadas por amastigotes. En el tracto digestivo del mosquito, los amastigotes se liberan de los macrófagos y se transforman en promastigotes, que se multiplican por fisión binaria y alcanzan la faringe y cavidad bucal del vector, de forma que en la siguiente alimentación del flebotomo se inyectan los promastigotes de nuevo en el hospedador vertebrado, reiniciándose el ciclo.

De todos los animales que potencialmente se pueden comportar como transmisores de esta enfermedad, el **perro** (*Canis familiaris*) es considerado el principal reservorio de la leishmaniosis visceral humana, causada por *L. infantum* (Peters, 1987; WHO, 1990), dado el estrecho contacto que existe entre el hombre y el perro como mascota. Sin embargo, otros animales, como caballos, ovejas, cabras, roedores y cánidos silvestres, han sido identificados como hospedadores de *Leishmania* spp., aunque no se conoce muy bien su papel como reservorios de esta enfermedad (Rioux, 1971; Hervas, 1996; Fisa, 1999; Solano-Gallego, 2003).

2.2.2 La Leishmaniosis canina

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) ha recibido informes de la presencia de casos de leishmaniosis canina en 42 países: 16 de Europa, 6 de África, 8 de Asia y 12 de América (OIE, 2004). Además, existen datos de leishmaniosis canina en países no endémicos, que son el resultado del desplazamiento de los animales parasitados a zonas libres de enfermedad.

La leishmaniosis canina es endémica en la Cuenca Mediterránea, Oriente Medio y en diversas zonas tropicales y subtropicales a nivel mundial (WHO, 1984). Las especies de *Leishmania* que se han aislado en el perro son numerosas. *L. infantum* se ha aislado principalmente en la Cuenca Mediterránea y Oriente Medio, *L. tropica* y *L. donovani* en el Viejo Mundo, y *L. chagasi* (actualmente se considera sinónimo de *L. infantum*), *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana* y *L. peruviana* en el Nuevo Mundo (Hashiguchi; 1991; Dereure, 1999, Llanos, 1999); sin embargo, el perro tiene una mayor importancia epidemiológica en la transmisión, principalmente, de *L. infantum* y también de *L. braziliensis* y *L. peruviana*.

El zimodeme *L. infantum* **MON-1** es el más frecuente en perros en la Cuenca Mediterránea, incluida España (Maazoun, 1981; Alvar, 1987; Fisa, 1999), si bien se han identificado otros zimodemes en perros y sus vectores en esta misma área (Pratlong, 1989; Gramiccia, 1992, Alvar, 1997; Fisa, 1999; Martín-Sánchez, 1999, 2004).

L. infantum afecta tanto a hombres como a perros y se transmite por la picadura de insectos del género *Phlebotomus*. La mayoría de los estudios epidemiológicos sobre prevalencia e incidencia de leishmaniosis en perros se basa en estudios serológicos. En la Cuenca Mediterránea la seroprevalencia de la leishmaniosis canina varía enormemente en las diferentes regiones, observándose desde valores mínimos, como el 2,4% en algunas zonas de España, hasta valores tan elevados como el 75% encontrado en Italia (Segovia, 1985; Oliva, 2006).

La resistencia o la susceptibilidad a la leishmaniosis por parte del hospedador depende del **sistema inmunitario** del mismo. En el curso de la leishmaniosis canina se produce una menor respuesta inmunitaria de tipo **celular**, o de linfocitos T (Martínez-Moreno, 1993), que son los responsables de luchar contra el parásito mediante la liberación de citocinas que a su vez estimulan secundariamente a los macrófagos. Las citocinas más importantes son la interleucina 2 (IL-2), que interviene en el proceso de división de los linfocitos T, y el interferón gamma (IFN-gamma), que activa los macrófagos y es considerado el factor de resistencia más importante frente a *Leishmania* spp. (Varela, 1992). Los macrófagos producen óxido nítrico, que parece mediar en la muerte apoptótica del parásito (Holzmüller, 2006). Además, aparece una activación de la respuesta inmunitaria de tipo **humoral**, mediada por los linfocitos B, que se transforman en células plasmáticas, y posteriormente se producen anticuerpos (Martínez-Moreno, 1993). Estos anticuerpos no protegen frente al parásito, pero además, al unirse a los antígenos, pueden formar inmunocomplejos que tienen efectos nocivos contra el animal, como la agregación plaquetaria, alteraciones en riñón, hígado, articulaciones, etc. (Varela, 1992). Así, los principales mecanismos fisiopatológicos por los cuales el parásito causa lesiones son la producción de una inflamación no supurativa y el depósito de inmunocomplejos en ciertos órganos (Ferrer, 1992). Por todo ello, existe la hipótesis de que la inmunidad protectora frente a la infección por *Leishmania* spp. es primariamente de tipo celular (Pinelli, 1994; Strauss-Ayali, 2007).

Muchos animales infectados por *Leishmania* spp. no desarrollan la enfermedad y permanecen asintomáticos. El hecho de que algunos animales desarrollen signos de enfermedad y otros no, podría deberse a diferencias genéticas individuales (Solano-Gallego, 2000; Quinnell, 2003b). El estado de aparente resistencia, en la que el animal

permanece infectado pero de forma asintomática, se ha asociado con el desarrollo de una respuesta inmunitaria de tipo celular y es posible que un estado de inmunosupresión acarree la aparición de los síntomas (Killick-Kendrick, 1994; Pinelli, 1994), mientras que el desarrollo de síntomas clínicos como respuesta a la infección se asocia a un aumento del título de anticuerpos (inmunidad humoral) y un descenso de la inmunidad celular (Pinelli, 1994; Cabral, 1998; Barbieri, 2006). No obstante, algunos autores consideran que los perros sintomáticos también pueden desarrollar una respuesta inmunitaria celular (Leandro, 2001; Quinnell, 2001).

Ante una infección por *Leishmania* spp., la presentación de signos clínicos podría estar asociada con una mayor diseminación y densidad de los parásitos por distintos tejidos y, a su vez, con un nivel elevado de anticuerpos (Martínez-Moreno, 1995; Solano-Gallego, 2001; Rodríguez-Cortes, 2007). En este sentido se ha descrito la asociación entre la intensidad de la parasitación en bazo, hígado, médula ósea y piel, y el estado clínico del animal (Sanchez, 2004; Reis, 2006).

Existen estudios que buscan **asociaciones** entre diversos factores relativos al animal y el padecimiento de esta enfermedad. Algunos señalan que la **raza** no parece influir en la presentación de esta enfermedad, dado que la leishmaniosis ha sido descrita en todo tipo de razas (Slappendel, 1988; Abranches, 1991a; Ozon, 1995; Miró, 2007), si bien la leishmaniosis se ha descrito con mayor frecuencia en el Boxer, Rottweiler, Pastor Alemán y razas grandes (Denerolle, 1996; Miranda, 2005), y otros ven un mayor padecimiento de la enfermedad entre la razas mixtas o cruces (Amusategui, 2003). Solano-Gallego y colaboradores consideran al Podenco Ibicenco como raza más resistente a padecer la enfermedad (Solano-Gallego, 2000). En cuanto al **sexo**, algunos describen un mayor número de machos afectados (Slappendel, 1988; Martínez, 1992; Denerolle, 1996; Fisa, 1999), aunque otros señalan que no existe asociación estadística para esta afirmación (Abranches, 1991a; Ozon, 1995; Miró, 2007). Parece que esta enfermedad se diagnostica con más frecuencia en animales **adultos** que en jóvenes (Martínez, 1992; Ozon, 1995, Miró, 2007). Sin embargo, algunos autores consideran que existen dos picos de afectación según la edad, uno de ellos en animales menores de tres años y el otro en animales entre ocho y diez años (Miranda, 2005). La mayoría de los diagnósticos se realizan en la fase de establecimiento de la enfermedad (Tesouro, 1995, Amusategui, 2003), siendo el porcentaje de casos que llegan a fases más avanzadas menor, normalmente porque la enfermedad se

diagnostica antes de llegar a esta fase (Tesouro, 1992). Algunos autores observan un título de anticuerpos más elevado en las formas viscerales de la enfermedad que en las formas cutáneas (Giauffret, 1976), aunque otros no encuentran tal asociación (Abranches, 1991a; Amusatogui, 2003). Otros estudios evidencian que cuanto más avanzada se encuentra la enfermedad, la afección de la médula ósea es mayor (Rodríguez, 1984; Franc, 1993). También existen trabajos que encuentran una correlación entre el título de anticuerpos y el proteinograma, que varían conjuntamente con los estadios de la enfermedad, y que a su vez están asociados a los signos clínicos, factores en los que se basa la clásica clasificación de la enfermedad en las diferentes fases (Roze, 1990; Carrera, 1996; Amusatogui, 2003), al contrario de lo que opinan otros autores (Vitu, 1973; Sanchis, 1976; Ferrer, 1992).

2.2.2.1 Cuadro clínico

Los signos clínicos de la leishmaniosis en perros varían en función del mecanismo patogénico de la enfermedad, de la respuesta inmunitaria del hospedador (Solbach, 2000), así como de factores genéticos, como ocurre en medicina humana (Blackwell, 2001; Bucheton, 2003). La sintomatología que produce esta enfermedad puede variar desde las formas latentes o asintomáticas hasta los cuadros graves (Tesouro, 1984b). Así, se debe tener en cuenta que no todos los animales infectados por *Leishmania* spp. desarrollan signos clínicos de enfermedad, pudiendo permanecer **asintomáticos**, pero son igualmente **infectantes para los vectores** (Abranches, 1991a; Molina, 1994; Alvar, 1994; Solano-Gallego, 2001), si bien parece que los animales sintomáticos son más infectantes para los flebotomos (Michalsky, 2007).

El período de incubación desde la picadura del flebotomo hasta la aparición de signos clínicos oscila desde pocos meses hasta varios años (Keenan, 1984b; Rodríguez, 1984; Franc, 1993; Rodríguez-Cortes, 2007), siendo 6-9 meses la duración media (Tesouro, 1992). Algunos autores dividen el curso de la enfermedad de forma didáctica en fases, según la evolución de la misma, distinguiéndose un período de incubación, fase de estado, fase de agravamiento, fase terminal, fase de remisión espontánea y fase de latencia (Tesouro, 1992b). Otros autores clasifican a los animales en función de los síntomas en: asintomáticos (sin signos), oligosintomáticos (signos moderados y no más de dos signos

clínicos) y sintomáticos (síntomas evidentes de enfermedad, incluyendo tres o más signos clínicos) (Molina, 1994; Fisa, 1999).

Según la presentación clínica, se distinguen dos formas de evolución: la **visceral**, de curso más rápido y pronóstico desfavorable, y la **cutánea**, de curso lento y pronóstico más favorable (Tesouro, 1992).

Generalmente el primer signo que aparece en el curso de la leishmaniosis es una lesión en la zona de inoculación del parásito, que se conoce como **chancro de inoculación**. Este chancro aumenta de tamaño rápidamente hasta unos 2 cm, y posteriormente se ulcera, quedando aparentemente como la lesión del Botón de Oriente en la leishmaniosis humana (Vidor, 1991; Franc, 1993; Cairó, 1997). Esta lesión del chancro de inoculación pasa por diferentes fases. En un primer momento aparece como lesión eritemo-escamosa de unos 10-15 mm de diámetro, rodeada de un anillo edematoso, posteriormente aparece como una lesión úlcero-costrosa de mayor tamaño (2-3 cm) y finalmente pasa por una fase precicatrizal hasta desaparecer (Vidor, 1991; Cairó, 1997). La mayor parte de los animales que desarrollan este chancro de inoculación visceralizan la enfermedad, lo que se manifiesta como una seroconversión y la presencia del parásito en médula ósea (Vidor, 1991). Dado que *Leishmania* spp. se disemina vía linfohematógena, puede alcanzar todos los órganos y tejidos; por tanto, la sintomatología que podemos encontrar es muy variada (Baneth, 2006).

Los signos clínicos que nos encontramos suelen ser de tipo **inespecífico** (Slappendel, 1988; Martínez, 1992; García-Verdugo, 1996; Ferrer, 1997a; Fernández-Bellón, 2008). Así, podemos observar adelgazamiento, con un aumento, disminución o mantenimiento del apetito (Tesouro, 1984a; Slappendel, 1988; Varela, 1992; Guy, 1993). La pérdida de peso se puede asociar a atrofia muscular generalizada, sobre todo en los músculos faciales (Tesouro, 1984a; Rodríguez, 1984; Slappendel, 1988; Franc, 1993). Este cuadro puede llevar al animal a estados caquéticos (Rodríguez, 1984; Slappendel, 1988). Otros síntomas posibles son: intolerancia al ejercicio, fatiga, abatimiento y alteraciones locomotoras como poliartritis y polimiositis con la producción de cojera (Tesouro, 1984a; Rodríguez, 1984; Slappendel, 1988; Blavier, 2001; Agut, 2003; Amusategui, 2003; de Souza, 2005). La temperatura corporal no suele verse afectada, si bien en ocasiones aparece hipertermia (Rodríguez, 1984; Slappendel, 1988; Franc, 1993).

Probablemente el signo más constante es la **linfadenopatía** (Tesouro, 1984a; García-Verdugo, 1996; Amusategui, 2003; Lima, 2004; Miró, 2007; Rossi, 2008). También puede presentarse una **esplenomegalia** y **hepatomegalia** (Slappendel, 1988; Franc, 1993; Baneth, 2006).

Un elevado porcentaje de animales infectados manifiestan **signos cutáneos** (Sánchez-Botija, 1936; Tesouro, 1984a; Longstaffe, 1985; Slappendel 1988; Martínez, 1992; Varela, 1992; Koutinas, 1999; Miró, 2007), los cuales generalmente comienzan en la cabeza, y posteriormente se extienden por todo el cuerpo. Estos signos cutáneos incluyen: alopecia, descamación, seborrea seca, hiperqueratosis de las almohadillas y dermatitis exudativa, sobre todo en el dorso de la trufa, región periocular, pabellón auricular, zonas articulares y relieves óseos (Tesouro, 1984a; Franc, 1993; Koutinas, 1999; Amusategui, 2003). Igualmente se pueden observar lesiones nodulares, granulomatosas y ulcerativas en mucosas (pene, lengua, cavidad oral, etc) (Font, 1996b; Lamotthe, 1997). No es infrecuente observar un crecimiento exacerbado de las uñas (Slappendel, 1990; Abranches, 1991a; Guy, 1993; Ozon, 1995; Amusategui, 2003).

También pueden aparecer alteraciones **oculares** de tipo muy variado y suelen estar ligadas al parásito o bien a los fenómenos inmunológicos que éste provoca (Roze, 1986; Laugier, 1992; García-Alonso, 1996; Koutinas, 1999; Peña, 2000; Naranjo, 2005), siendo el signo más predominante la uveítis (Molleda, 1993; Peña, 2000).

Las alteraciones **digestivas** son poco frecuentes (Sánchez-Botija, 1936; Tesouro, 1984a; Amusategui, 2003), aunque se puede observar colitis crónica (Ferrer, 1995) y pancreatitis (Carrasco, 1997). La función hepática pocas veces se ve alterada (Cabassu, 1988b; Gascón, 1994).

En algunos casos se observan fallos hemostáticos, que pueden causar **epistaxis** (Slappendel, 1988; Martínez, 1992; Franc, 1993; Denerolle, 1996; Juttner, 2001). Ello puede deberse a vasculitis, alteraciones de la agregación plaquetaria y alteraciones en los factores de coagulación y fibrinólisis (Ciaramella, 2005).

También se han descrito alteraciones en el aparato **reproductor**, como orquitis y epididimitis, entre otros, en machos (Martínez, 1992), o aborto y momificaciones de los cachorros en hembras. Algunos autores consideran que la leishmaniosis no agrava el cuadro clínico en hembras gestantes (Varela, 1992), al contrario de lo descrito por otros (Cairó, 1991).

Raramente se observan síntomas **respiratorios** (Slappendel, 1988; Amusategui, 2003) y, con poca frecuencia, problemas **cardiacos**, como pericarditis o taponamiento pericárdico (Font, 1993; Lamothe, 1997) o síntomas nerviosos, como meningitis (Tesouro, 1984a; Rodríguez, 1984; Franc, 1993; Lamothe, 1997; Vinuelas, 2001).

En fases avanzadas de la enfermedad pueden aparecer trastornos **renales** (Tesouro, 1984a; Rodríguez, 1984), provocando vómitos, deshidratación, polidipsia y poliuria, entre otros (Koutinas, 1995), siendo estos dos últimos los más frecuentes (Amusategui, 2003). Ello se produce, la mayoría de las veces, debido a la aparición de una glomerulonefritis inmunomediada (Bergeaud, 1988), que a su vez puede progresar a insuficiencia renal y, con ello, a la muerte del animal (Franc, 1993).

2.2.2.2 Hallazgos laboratoriales

Como alteración laboratorial frecuente se puede encontrar una **anemia**, que suele ser normocítica, normocrómica y no regenerativa (Keenan, 1984; Rodríguez, 1984; Cairó, 1991), y puede acentuarse con el progreso de la enfermedad (Rodríguez, 1984). Sin embargo, otros autores observan anemia en un bajo porcentaje de animales (Cabassu, 1988b; Denerolle, 1996; Amusategui, 2003).

Además puede aparecer tanto una **leucopenia** (Rodríguez, 1984; Keenan, 1984; Slappendel, 1988; Franc, 1993) como una **leucocitosis** (Rodríguez, 1984). La presencia de eosinofilia es inconstante (Sanchís, 1976; Rodríguez, 1984; Martínez, 1992).

En algunos casos se observa **trombocitopenia**, pero también es un hallazgo inconstante (Rodríguez, 1984; Denerolle, 1996).

Las **proteínas séricas** totales suelen estar aumentadas por una hiperglobulinemia habitualmente policlonal (beta y gammaglobulinas), sobre todo por aumento de las gammaglobulinas (Groulade, 1983; Keenan, 1984; Tesouro, 1984a; Rodríguez, 1984; Slappendel, 1988; Denerolle, 1996; Carrera, 1996; Amusategui, 2003), aunque también puede ser monoclonal (Vitu, 1973; Font, 1996a). La hiperproteinemia suele ir acompañada de una **hipoalbuminemia** (Groulade, 1983; Keenan, 1984; Tesouro, 1984a; Rodríguez, 1984; Slappendel, 1988; Martínez, 1992; Denerolle, 1996; Koutinas, 1999; Amusategui, 2003), debido a la pérdida de proteínas por procesos como enteropatías, nefropatías, hepatopatías o malnutrición (Tesouro, 1984b; Kontos, 1993), causando una inversión del cociente albúmina/globulinas (Rodríguez, 1984).

En el urianálisis se puede observar proteinuria (Cabassu, 1988b) y ocasionalmente hematuria (Cabassu, 1988a), con alteración del cociente proteína/creatinina (Cortadellas, 2008). La insuficiencia renal, como hemos mencionado, se asocia con mal pronóstico.

Raramente se encuentra afectada la funcionalidad hepática (Cabassu, 1988b, Gascón, 1994) y suele producirse por una hepatitis crónica por la presencia de parásitos en el órgano.

Algunos perros con leishmaniosis pueden ser positivos al **Test de Coombs** y presentar **anticuerpos antinucleares** (Lucena, 1996; Smith, 2004; Baneth, 2006).

2.2.3 Diagnóstico

Una anamnesis e historia clínica completas, incluyendo en especial la historia de exposición a vectores, con aparición de una sintomatología clínica y una analítica sugerente de leishmaniosis, nos pueden orientar en el diagnóstico de esta enfermedad, pero no nos confirman la infección, siendo necesario utilizar otros métodos diagnósticos.

En zonas endémicas, la electroforesis de proteínas séricas o proteinograma resulta especialmente relevante en el diagnóstico de la leishmaniosis. Una alteración en el

proteínograma es indicativo de sospecha de esta enfermedad y orienta en el diagnóstico (Groulade, 1983).

Existen distintos métodos diagnósticos de leishmaniosis, divididos en: parasitológicos, serológicos y moleculares.

2.2.3.1 Métodos parasitológicos

El diagnóstico definitivo de la leishmaniosis consiste en la visualización directa de los amastigotes de *Leishmania* spp. a partir de muestras **citológicas** o **histológicas** de médula ósea, ganglios, piel, bazo u otros órganos (Sánchez-Botija, 1936; Abranches, 1991a; Mc Conkey, 2002). No se recomienda el diagnóstico parasitológico directo a través de sangre, puesto que la parasitemia no es frecuente en esta enfermedad (Tesouro, 1984b). La citología de ganglio es fácil de realizar, si bien los resultados no son constantes, por lo que algunos consideran idóneo realizar la toma de muestra de la médula ósea (Denerolle, 1996). La detección de una sola célula parasitada por *Leishmania* spp. sería patognomónica de infección. Los métodos inmunocitoquímicos, como la inmunoperoxidasa, facilitan la identificación de los parásitos en las preparaciones procedentes de tejidos (Ferrer, 1988; García-Verdugo, 1996).

Igualmente es posible el **cultivo** de los promastigotes de *Leishmania* spp. a partir de ganglios, médula ósea u otros tejidos. Los medios universalmente aceptados y más frecuentemente utilizados son los medios difásicos de agar sangre (Novy-MacNeal-Nicolle o NNN) y los medios líquidos para cultivos de células (Schneider, medio del Roswell Park Memorial Institute o RPMI, etc), enriquecidos con suero fetal bovino (Fernández-Bellón, 2008). Además, se puede realizar una inoculación del parásito en animales de experimentación (Slappendel, 1990; Buffet, 1996).

La identificación de las especies de *Leishmania* se realiza tradicionalmente por **electroforesis de isoenzimas** y constituye el método de referencia para la identificación precisa del parásito, aunque no suele ser una técnica práctica (Rioux, 1990; Rondón, 2006).

Como hemos mencionado con anterioridad, *L. infantum* zymodeme MON-1 es el más frecuente en perros en la Cuenca Mediterránea.

Aunque poco usado en la práctica, el **xenodiagnóstico** es una técnica para la detección y aislamiento de un patógeno usando su vector natural o, lo que es lo mismo, someter al animal sospechoso de infección a las picaduras de flebotomos para posteriormente tratar de detectar el parásito en el vector (Molina, 1994; Alvar, 1994). Es un método útil para determinar la importancia epidemiológica de los animales que actúan como reservorios de este parásito, sobre todo en animales asintomáticos (Molina, 1994). Sin embargo, estos métodos se consideran poco prácticos y se suelen realizar casi exclusivamente en labores de investigación.

El grado de parasitación depende del tiempo de infestación, por lo que en fases iniciales, el hallazgo del agente es más difícil, ya que hay escasos parásitos circulantes, obteniéndose en estos casos un mayor número de falsos negativos (Tesouro, 1992; Alvar, 1994).

2.2.3.2 Métodos serológicos

Una buena alternativa diagnóstica lo constituyen las pruebas **serológicas** (Neogy, 1992), que permiten valorar la inmunidad humoral mediante la detección de anticuerpos específicos circulantes frente al parásito.

Cuando se produce la parasitosis, en un primer momento predominan las inmunoglobulinas de tipo G (Ig G) (Vitu, 1973) y posteriormente se pueden detectar las de tipo M y A (Ig M e Ig A) (Vitu, 1973; Slappendel, 1988). El aumento de estas inmunoglobulinas parece estar correlacionado con la aparición de signos clínicos (Rodríguez-Cortes, 2007).

Existe un gran número de pruebas serológicas, como son la fijación del complemento, reacciones de aglutinación, tanto directa como indirecta, reacciones de precipitación como la inmunodifusión radial doble de Ouchterlony y la

contrainmunolectroforesis (CIEF), la técnica de la formol-gelificación, la serofloculación, etc. (Sánchez-Botija, 1936; Lanotte, 1974; Monjour, 1978; Rassam, 1980; Neogy, 1992). De entre todas las pruebas serológicas, las más utilizadas son la inmunofluorescencia indirecta o **IFI** (Lanotte, 1974; Cairó, 1991; Franc, 1993; Tesouro, 1984b, 1992, 1995) y distintos tipos de enzimoimmunoassay, como el *enzyme-linked immunosorbent assay* o **ELISA**, dot-ELISA, ELISA indirecto, etc. (Slappendel, 1990; Tesouro, 1992, Guy, 1993; Fisa, 1997; Ferrer, 1995; Riera, 1999; Solano-Gallego, 2005). También se emplean el test de aglutinación directa (**DAT**) e indirecta (**IHAT**) (Neogy, 1992), el Western Blot (**WB**) (Aisa, 1998) y la inmunocromatografía.

La técnica de IFI es más subjetiva en su interpretación que la técnica ELISA (Tesouro, 1984b), si bien ambas poseen una elevada sensibilidad y especificidad (Rodríguez, 1988; Mancianti, 1995; García- Verdugo, 1996). El umbral de positividad se suele fijar en el valor de dilución 1:100 (Lanotte, 1974; Tesouro, 1984b; Franc, 1993; Laruelle-Magalon, 1996) pero es variable en función de los laboratorios, el antígeno empleado y las poblaciones estudiadas (Portús, 1997).

Para algunos autores, estas técnicas indican exposición al parásito, lo que no implica necesariamente infección activa (Ferrer, 1997b). Una serología positiva, con sintomatología compatible con leishmaniosis sería suficiente para el diagnóstico, pero si los títulos son positivos o dudosos, con sintomatología no característica de esta enfermedad, hay que ser precavidos. Un resultado por debajo del umbral de positividad no descartaría la enfermedad, y ante títulos bajos hay que pensar en distintas posibilidades, como que el animal se encuentre en una fase temprana o en período de incubación de la enfermedad, que no exista una buena respuesta inmunitaria del animal, incluyendo también los casos tratados con corticoides en los que la respuesta inmunitaria es pobre o que sea un caso de infección asintomática, en las que existe una inmunidad celular protectora suficiente para prevenir la invasión visceral por el parásito (Euzeby, 1982; Tesouro, 1984b; Ferrer, 1995; Fisa, 1997; Cabral, 1998). En estos casos dudosos se recomienda repetir la prueba a los 15-30 días, para evitar los falsos negativos (Euzeby, 1982; Ferrer, 1995). Otros autores recomiendan la repetición a los 30-40 días (Tesouro, 1984b).

Como ya hemos comentado anteriormente para otros agentes, en el caso de la leishmaniosis los títulos de anticuerpos disminuyen tras el tratamiento y continúan

disminuyendo en los meses posteriores al mismo (Amusategui, 1998), aunque en algunos casos se ha observado un ligero aumento del nivel de anticuerpos justo después de la instauración del tratamiento, que posteriormente disminuye (Amusategui, 1998).

Otra técnica de diagnóstico es la **prueba de Montenegro o Leishmanina** (Montenegro, 1926), que consiste en la inoculación de extractos del parásito en piel, que conlleva la aparición de una reacción de hipersensibilidad de tipo celular, en el caso de que el animal esté infectado, que se manifiesta en rubor y tumefacción del área inoculada. Esta técnica es similar a la prueba de la tuberculina. Parece que el grado de respuesta a esta técnica depende de la preparación de leishmanina (promastigotes/ml) usada (Solano-Gallego, 2001b).

2.2.3.3 Métodos moleculares

En los últimos años se viene investigando el uso de **técnicas moleculares**, como la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Ferrer, 1997b, Piarroux, 1997), para la detección de *Leishmania* spp. Esta técnica parece que aumenta la sensibilidad diagnóstica con una elevada especificidad. Existen distintos protocolos que tienen como diana distintos genes: el RNAr, el operón ribosómico o el ADN del kinetoplasto (kDNA) (Ashford, 1995; Fisa, 2001; Solano-Gallego, 2001a; Lachaud, 2002; Iniesta, 2002). Las técnicas moleculares permiten detectar cantidades muy pequeñas del agente en **sangre u otros tejidos** (Berrahal, 1996; Solano-Gallego, 2001a), considerándose, por algunos autores, la PCR de piel como la técnica más sensible, dado que parece que es la piel el tejido más accesible y de reserva para los parásitos de *Leishmania* spp (Solano-Gallego, 2001a). Algunos autores consideran a la técnica PCR, concretamente a partir de médula ósea, un método más eficaz de diagnóstico que la serología (Ashford, 1995) y, entre ellos, hay quienes afirman que la carga parasitaria en médula ósea es mucho mayor que en sangre (Rodríguez-Cortes, 2007), con lo que sería más apropiada su detección en este órgano, si bien otros afirman que la PCR de médula ósea no es un método muy adecuado de diagnóstico (Solano-Gallego, 2001a). Las técnicas moleculares podrían ser muy útiles en la detección de infección en animales clínicamente curados tras el tratamiento (Roura, 1997; Steuber, 1997), si bien, como hemos mencionado en el caso de las ehrlichiosis, estas

técnicas también tienen sus limitaciones. Igual que en las rickettsiosis, existen casos que presentan una PCR positiva pero la serología resulta negativa (Solano-Gallego, 2001a) y las posibles explicaciones coinciden con lo mencionado en el caso de las ehrlichiosis.

También se viene usando en el diagnóstico de la leishmaniosis la PCR en **tiempo real** o cuantitativa, que, para algunos autores, es más útil que la PCR convencional (Francino, 2006; Rodríguez-Cortés, 2007).

2.2.4 Diagnóstico diferencial

Dado que esta enfermedad se caracteriza por presentar signos inespecíficos, sería de interés hacer un diagnóstico diferencial con otras patologías que pudieran cursar con los mismos signos, como son los problemas de piel y muchas enfermedades crónicas y caquetizantes (Franc, 1993).

Algunas enfermedades de la **piel** del tipo de las tiñas, demodicosis, queratoseborreas, neoplasias, granulomas micóticos o dermatitis por lamido, así como alteraciones cutáneas con expresión nodular (quistes cutáneos, mastocitoma y linfoma cutáneo) o pustular (pénfigo foliáceo o eritematoso, dermatosis pustular subcorneal o pustulosis eosinofílica estéril), o el granuloma eosinofílico o micobacteriano, micosis generalizada y ciertas neoplasias, deben ser incluidas en el diagnóstico diferencial (Amusategui, 1999).

También debemos incluir el **lupus eritematoso sistémico** en el diagnóstico diferencial, ya que comparte con la leishmaniosis su carácter multisistémico y el cuadro clínico (Amusategui, 1999).

La coinfección de esta enfermedad con **ehrlichiosis**, **hepatozoonosis**, **filariosis** y/o **babesiosis** es posible, con lo que, deberían también ser incluidas en el diagnóstico diferencial (Sanchez-Botija, 1936; Varela, 1992; Sainz, 1996b, Tesouro, 1995b). De nuevo, cabe señalar que en nuestro entorno geográfico, es bastante frecuente confundir la leishmaniosis con una ehrlichiosis (Tesouro, 1993; Sainz, 1996b ; Guillén, 2002).

Otras patologías a diferenciar serían las **infecciones** bacterianas cutáneas, **hipotiroidismo**, **tumores** linfoides y **tuberculosis**, entre otros (Sánchez-Botija, 1936; Cabassu, 1988a; Cairó, 1991)

2.2.5 Tratamiento

Son múltiples los fármacos y protocolos utilizados en leishmaniosis canina, si bien ninguno elimina completamente la infección (Noli, 2005). Los antimoniales son los fármacos que más se han empleado en el tratamiento de esta enfermedad, en un primer momento en su forma trivalente y posteriormente en forma pentavalente, debido a la elevada toxicidad de los primeros.

Así, los antimoniales pentavalentes (Sb^{5+}) **antimoniato de meglumina** (Glucantime®), y **estibogluconato sódico** (Pentostam®) parecen los fármacos de elección (Euzeby, 1988; Moss, 1992; Tesouro 1995a; Denerolle, 1996; Baneth, 2006). Ambos son parecidos en eficacia y toxicidad (Lagardere, 1992), pero difieren en la concentración de Sb^{5+} de cada uno de ellos. Los protocolos terapéuticos varían de unos autores a otros (Tesouro, 1995a; Ferrer, 1997b). El Glucantime® se suele emplear a dosis de 100 mg/kg en inyección diaria (Cairó, 1991; Denerolle, 1996), aunque otros autores usan dosis más altas y en días alternos (Euzeby, 1988; Martínez, 1992). El Pentostam® se emplea a dosis más bajas (10-20 mg/kg) (Reiter, 1985), aunque también se ha empleado a dosis mayores (Reiter, 1985). Su administración por vía IM es muy empleada (Euzeby, 1982; Rodríguez, 1984; Tesouro, 1995a), si bien algunos autores los emplean vía intravenosa (IV) para evitar los efectos colaterales de la vía intramuscular (IM), como abscesos o fibrosis en el punto de inoculación (Longstaffe, 1986). Otros usan la vía subcutánea (SC) (Roze, 1994; Denerolle, 1996; Ferrer, 1997b), posiblemente movidos por los resultados obtenidos en algunos estudios en los que se observa una mayor permanencia del fármaco en el organismo por esta vía (Tassi, 1994).

Existe gran variedad en la pauta y duración del tratamiento, variando de 1 a 3 ciclos, cada ciclo de duración entre 5 y 60 días, con intervalos de descanso entre ellos entre

7 días y 1 mes (Longstaffe, 1986; Euzeby, 1988; Cairó, 1991; Martínez, 1992; Tesouro, 1995a; Denerolle, 1996). Lo **más frecuente** es emplear 20-30 inyecciones de Glucantime® (administrado vía SC, IM o IV) a dosis de 100 mg/kg/día, en 2-3 ciclos de 10 a 15 días (Longstaffe, 1986; Amusategui, 1995a; Baneth, 2002). Para el Pentostam®, se suelen emplear 10-20 mg/kg/día en 2 ciclos de 8 o 10 días, separados por descansos de 8 a 10 días (Euzeby, 1988; Tassi, 1989; Amusategui, 1995a).

Estos fármacos suelen ser bien tolerados (Roze, 1994), aunque pueden producir algunos **efectos adversos** indeseados, como fiebre, mialgias, vómitos, diarreas, hemorragias, dolores de cabeza, síncope, erupciones cutáneas, apatía, inapetencia, rigidez y complicaciones hepáticas y renales (Rodríguez, 1984; Euzeby, 1988; Tassi, 1989, Amusategui, 1995a). En el punto de inyección también pueden aparecer abscesos o tumefacción local (Longstaffe, 1986). Además puede producirse cardiotoxicidad, generalmente reversible al suspender el tratamiento (Mattot, 1992). Se han visto también nódulos cutáneos granulomatosos y uveítis y queratoconjuntivitis ulcerosa (Slappendel, 1988; Rosychuck, 1991). El parásito, por sí mismo, también puede desencadenar tras el tratamiento fenómenos de hipersensibilidad, así como lesiones hepáticas y renales (Euzeby, 1982; Rosychuck, 1991; Varela, 1992).

Los antibióticos derivados de los polienos, como la **anfotericina B** (AmBisome®, Fungizone®), se usan como antifúngicos, pero tienen también actividad frente a los protozoos y se usan, junto con las pentamidinas, cuando falla el tratamiento con antimoniales (Mishra, 1992; Murray, 1993). Se emplea a dosis variable de 0,1 a 1 mg/kg, en infusión endovenosa (Rodríguez, 1984; Euzeby, 1988; Tesouro, 1995a; Amusategui, 1995a), en dosis crecientes graduales, aunque los protocolos terapéuticos varían según los autores (Tesouro, 1995a). Su toxicidad, especialmente sobre el riñón, hace que sea necesario un control de la función renal constante (Euzeby, 1988).

Los **derivados del imidazol**, como el metronidazol (Flagyl®), secnidazol (Flagentil®) y el ketoconazol (Panfungol®), son antifúngicos usados también en el tratamiento de las leishmaniosis (Euzeby, 1982). En general son poco tóxicos (Longstaffe, 1986), aunque el ketoconazol ha demostrado ser nefrotóxico (D'Ambrosio, 1987; Euzeby, 1988). Mas recientemente se viene usando el itraconazol, que produce una toxicidad

mínima (Dogra, 1997), pero en algunos casos no ha ofrecido buena respuesta (Bravo, 1993).

Otros fármacos que se pueden utilizar son las **diamidinas aromáticas** (Pentamidina®) y la **aminosidina** (Rhalem, 1997; Poli, 1997). Las diamidinas se utilizan en el tratamiento de las tripanosomiasis y muchos las consideran fármacos de segunda elección en el tratamiento de las leishmaniosis cuando el uso de antimoniales resulta ineficaz (Euzeby, 1982). La dosis más comúnmente empleada de Pentamidina® es de 4 mg/kg vía intramuscular, 3 inyecciones por semana durante 5-7 semanas ó 20 inyecciones en días alternos (Mishra, 1992; Amusatogui, 1995a; Rhalem, 1997). Dado su efecto sinérgico cuando se emplea en combinación con el antimonio de meglumina (Neal, 1995), algunos autores recomiendan la combinación de la pentamidina con antimoniales, sobre todo cuando no hay buena respuesta a estos últimos, aplicándose 10-15 inyecciones de cada uno de los 2 principios activos intercalados o consecutivamente (Euzeby, 1988; Piarroux, 1996), aunque no siempre se obtienen buenos resultados.

Los análogos de las purinas (pirazolopirimidinas), como el **alopurinol** (Ziloric®), también se usan para tratar estas infecciones. Es activo vía oral, a diferencia de los otros fármacos, y se emplea o bien sólo o junto a otros fármacos (Tesouro, 1995a), a dosis de 10-20 mg/kg/día (Kager, 1981; Aguiló, 1994). Las pirazolopirimidinas son, en general, poco tóxicas (Rojas, 1987; Denerolle, 1996), aunque el alopurinol puede producir algunos efectos colaterales como erupción cutánea, fiebre, leucopenia, náuseas, vómitos y diarreas. A dosis muy elevadas puede producir hiperxantinuria y, con ello, cálculos de xantina (Sorenson, 1993). Se suele usar en combinación con los antimoniales, y posteriormente como tratamiento de mantenimiento (Amusatogui, 1999), aunque también se puede combinar con otros fármacos como la anfotericina B (Tesouro, 1995a).

La **Miltefosina** (Impavido®) es otro fármaco más reciente, que posee también la ventaja de la administración oral y que podría ser eficaz en casos de leishmaniosis (Soto, 2004).

Puesto que la infección por *Leishmania* spp. desencadena una activación de la respuesta humoral, con la producción de anticuerpos que pueden ser nocivos para el hospedador por las lesiones tisulares que producen, y además una disminución de la

respuesta celular, que combate los parásitos, se vienen usando **inmunomoduladores** (Amusategui, 1995b), cuyo objetivo es deprimir la inmunidad humoral (inmunosupresores) o estimular la inmunidad celular (inmunoestimulantes). Algunos inmunosupresores empleados son los corticoides, como la prednisona o prednisolona, y algunos inmunoestimulantes son el levamisol y las citocinas (Amusategui, 1995b). Se utilizan además otros fármacos como coadyuvantes, que actúan sobre el sistema inmunitario: interferón-gamma, el bacilo de Calmette y Guérin, etc (Arboix, 1997; Lamothe, 1999).

Además, como **terapia de apoyo** para paliar algunos síntomas secundarios o asociados a la leishmaniosis, se puede instaurar una fluidoterapia o transfusiones sanguíneas o de plasma, así como emplear antibióticos de amplio espectro, antiinflamatorios, reconstituyentes generales y dietas especiales (Euzeby, 1982; Martínez, 1992; Roze, 1994; Tesouro, 1995a).

2.2.6 Control de la leishmaniosis canina

La erradicación de esta enfermedad es muy difícil, dado que presenta largos períodos de incubación y que existen animales en estado asintomático. Un diagnóstico temprano de la enfermedad, el tratamiento farmacológico oportuno y precoz, y el control de los vectores (tanto la lucha contra los vectores adultos, como el impedimento de la picadura del mismo mediante el uso de insecticidas en los perros), son los medios más importantes para controlar esta enfermedad (Alvar, 1994; Killick-Kendrick, 1997; Alexander, 2003).

La lucha frente a los **vectores** mediante insecticidas conlleva a un problema ecológico (Catarsini, 1989); sin embargo, se puede reducir la **exposición** del perro a estos vectores, limitando las salidas de los animales a ciertas horas de máxima actividad del flebotomo, como en el amanecer y anochecer (Slappendel, 1988) o empleando trampas para los vectores (Catarsini, 1989).

El uso de **insecticidas** tópicos en el perro, en forma de collares, pipetas u otros preparados, es una medida muy eficaz de control de la picadura por parte de los flebotomos

(Quiles, 1979; Catarsini, 1989). El empleo de collares impregnados en deltametrina (Killick-Kendrick, 1997) y las pipetas a base de imidacloprid y permetrina (Otranto, 2007) han mostrado ser eficaces para repeler los flebotomos.

En cuanto al **perro** como reservorio, resulta difícil el control en el mismo (mediante su sacrificio); así pues, la detección y tratamiento de los animales afectados sería una medida más importante para controlar esta enfermedad (Mancianti, 1988; Gradoni, 1988).

El desarrollo de **vacunas** frente a esta enfermedad se encuentra aún en desarrollo. Los distintos ensayos realizados incluyen parásitos muertos o vivos atenuados, proteínas recombinantes de *Leishmania* spp., proteínas codificadoras de ADN de *Leishmania* spp. o inmunomoduladores a partir de saliva de flebotomos (Latifynia, 2008).

2.2.7 La leishmaniosis en la especie felina

2.2.7.1 Etiología y epidemiología

El gato es considerado como un hospedador poco habitual para *Leishmania* spp. (Costa-Durao, 1994; Passos, 1996; Ozon, 1998) y su papel real como reservorio potencial de *Leishmania* spp. es aún desconocido, aunque sugerido (Simoes-Mattos, 2005). La creciente descripción de casos de leishmaniosis felina en la literatura hace pensar que los gatos pueden desempeñar un papel en la epidemiología de la leishmaniosis (Mancianti, 2004).

La primera detección de *Leishmania* spp. en gatos data de 1912 (Sergent, 1912). Desde entonces, se han descrito aproximadamente 50 casos de leishmaniosis felina, sobre todo en áreas donde la enfermedad es endémica (Pennisi, 2002), aunque también se ha descrito algún caso de leishmaniosis felina en áreas no endémicas (Savani, 2004).

Esta enfermedad ha sido descrita en gatos en muchos países, como Portugal (Costa-Durao, 1994; Maia, 2008), Francia (Laruelle-Magalon, 1996; Ozon, 1998), Italia (Pennisi, 1999; Poli, 2002), España (Ondovilla, 1933; Hervas, 1999; Leiva, 2005), Suiza (Rufenacht,

2005), Estados Unidos (Craig, 1986; Barnes, 1993), Brasil (Mello, 1940; Passos, 1996; Savani, 2004), Venezuela (Bonfante-Garrido, 1991), Argentina (Mazza, 1927), Egipto (Morsy, 1994), Jordania (Morsy, 1980), Iraq (Machattie, 1931), Argelia (Bosselut, 1948) y Vietnam (Bergeon, 1927).

El aumento en la notificación de nuevos casos de infección natural en el gato podría explicarse por una mayor incidencia de la infección, por avances en las técnicas diagnósticas o por el mayor cuidado que se le da a esta mascota, sobre todo en países desarrollados (Simoes-Mattos, 2005).

En el área Mediterránea, el zimodeme **MON-1** de *L. infantum* es el implicado en la mayoría de casos de leishmaniosis humana y canina en zonas endémicas, y ésta misma ha sido aislada de gatos infectados (Ozon, 1998; Grevot, 2005).

La primera infección experimental en gatos fue llevada a cabo por Kirkpatrick y colaboradores en 1984. En ella se inocularon en gato, vía intravenosa e intradérmica, promastigotes y amastigotes de *L. chagasi* y *L. donovani*, y en todos los casos se observó una elevación del título de anticuerpos frente a *Leishmania* spp., aunque sin el desarrollo de signos clínicos (Kirkpatrick, 1984).

La infección natural por *Leishmania* spp en gatos, en cualquier caso, parece poco común. La seroprevalencia de *Leishmania* spp. en gatos en el Sur de Europa varía del 1,7% (Portus, 2002) al 68% (Pennisi, 2002). Para algunos autores, los valores de seropositividad a *Leishmania* spp. en gatos se están aproximando a aquellos descritos en perros en áreas endémicas (Maroli, 2007); sin embargo, ciertas diferencias en la respuesta inmunitaria, la preferencia de los vectores hacia otras especies animales o la **resistencia natural** innata del gato a adquirir ciertas enfermedades vectoriales, como se observa en las infecciones experimentales (Kirkpatrick, 1984; Mancianti, 2004), podrían explicar las más bajas prevalencias con respecto a los valores encontrados en perros (Tabar, 2008). Esta resistencia del gato a la infección por *Leishmania* spp. probablemente también depende de factores genéticos, no estrictamente relacionados con la inmunidad del animal (Mancianti, 2004). Sin embargo, y a pesar de todo ello, la posibilidad de infección del gato en zonas endémicas podría ser elevada (Leiva, 2005).

Se ha sugerido que la enfermedad se transmite igualmente por **flebotomos**, dado que ha sido posible la infección experimental de los mismos al alimentarse en gatos infectados (Maroli, 2007). Algunos estudios muestran que los gatos son más atractivos para los flebotomos que los perros (Johnson, 1993; Ogosuku, 1994), sin embargo, en algunos estudios de alimentación de flebotomos en diversas especies, el flebotomo no parece alimentarse del gato, sugiriéndose que las preferencias del flebotomo podrían estar asociadas a la disponibilidad de los animales más que a su atracción por una especie en concreto (Bongiorno, 2003).

En cualquier caso, no está claro el papel del gato en esta enfermedad. Algunos autores piensan que es meramente un **hospedador accidental** (Passos, 1996; Gramiccia, 2005), mientras que otros lo consideran un **reservorio** potencial para *Leishmania* spp. (Morsy, 1980; Poli, 2002; Martín-Sánchez 2007; Solano-Gallego, 2007; da Silva, 2008; Maia, 2008). Debido a la naturaleza depredadora nocturna de los gatos, éstos pueden representar un punto de unión entre el medio doméstico y el selvático, favoreciendo la diseminación del parásito (da Silva, 2008).

El papel de ciertos virus inmunosupresores, como el virus de la leucemia o la inmunodeficiencia felinas (**FeLV** o **FIV**), está aún por aclarar. Distintos autores piensan que podrían (Hervas, 1999; Pennisi, 2002; Simoes-Mattos, 2005) o no (Vita, 2005; Solano-Gallego, 2007; Martín-Sánchez, 2007) favorecer la presentación de la leishmaniosis en el gato, si bien la sola presencia de estos virus inmunosupresores no parece ser suficiente para provocar un estado de inmunodeficiencia. Idealmente se deberían realizar recuentos de linfocitos CD4+, CD8+ y subpoblaciones linfocitarias para evaluar realmente cómo se encuentra la función del sistema inmunitario (Poli, 2002).

2.2.7.2 Signos clínicos de la leishmaniosis felina

Los signos clínicos de la leishmaniosis en gatos no están bien definidos, pero parece ser que son similares a aquellos que manifiesta el perro.

La leishmaniosis en gatos puede presentarse en sus formas visceral y cutánea. La forma **cutánea** es la más común y más descrita (Machattie, 1935; Mello, 1940; Craig, 1986; Bonfante-Garrido, 1991; Barnes, 1993; Morsy, 1994; Laruelle-Magalon, 1996; Passos, 1996; Ozon, 1998; Hervas, 1999; Poli, 2002; Schubach, 2003; Simoes-Mattos, 2005; Rufenacht, 2005; de Souza, 2005), siendo la forma **visceral** más raramente detectada (Denuzière, 1977; Morsy, 1980; Hervas, 1999; Savani, 2004; Grevot, 2005; Leiva, 2005; Dalmau, 2008) y acompañándose, casi siempre, de signos cutáneos. La forma cutánea de la enfermedad parece que está más extendida de lo que ha sido documentada, por los signos inespecíficos que provoca y por su dificultad diagnóstica.

Los **signos cutáneos** típicos incluyen úlceras y nódulos similares a los que se presentan en la leishmaniosis canina (Hervas, 1999; Poli, 2002). Las lesiones aparecen generalmente en la nariz (Pennisi, 1999), menos frecuentemente en las orejas (Craig, 1986) o bien en ambas localizaciones (Machattie, 1931; Mello, 1940; Bonfante-Garrido, 1996). También se pueden encontrar lesiones en labios, párpados y espacios interdigitales (Passos, 1996; Laruelle-Magalon, 1996; de Souza, 2005; Dalmau, 2008). Los amastigotes de *Leishmania* spp. pueden persistir en las lesiones cicatriciales, como se ha observado en perros (Oliveira-Lima, 1996), lo cual podría explicar las recidivas (Barnes, 1993). Asimismo pueden aparecer otros signos cutáneos como alopecia y dermatitis granulomatosa (Goodfellow, 2005). Por todo esto, la leishmaniosis felina debería incluirse en el diagnóstico diferencial cuando existen lesiones cutáneas compatibles con infección por *Leishmania* spp., sobre todo en áreas endémicas de esta enfermedad.

También son frecuentes las **alteraciones oculares** en esta especie, siendo la uveítis el signo ocular más común. (Laruelle-Magalon, 1996; Hervas, 2001; Pennisi, 2004; Leiva, 2005).

Los signos **generales** encontrados en casos de leishmaniosis felina son: depresión, anorexia, fiebre, deshidratación, pérdida de peso, mucosas pálidas, secreción nasal y ocular, linfadenomegalia, vómitos, diarrea, disnea y otros signos respiratorios, estomatitis, linfadenomegalia, hepato-esplenomegalia, polidipsia, poliuria y otros cuadros renales (Costa-Durao, 1994; Hervas, 1999; Pennisi, 2002, 2004; Poli, 2002; Goodfellow, 2005; Vita, 2005; Leiva, 2005; Dalmau, 2008).

2.2.7.3 Alteraciones laboratorias de la leishmaniosis felina

Las alteraciones laboratorias más frecuentes son similares a las encontradas en la especie canina: anemia no regenerativa, leucocitosis o leucopenia, trombocitopenia, hiperproteinemia debido a una hiperglobulinemia, motivada a su vez por una hipergammaglobulinemia generalmente monoclonal, valores elevados de urea y creatinina y proteinuria (Pennisi, 2002, 2004; Leiva, 2005)

2.2.7.4 Diagnóstico de la leishmaniosis felina

Como en el caso de las leishmaniosis caninas, una completa **historia clínica** y una **sintomatología** compatible con leishmaniosis nos pueden orientar en el diagnóstico. Como hemos mencionado, la aparición de la forma cutánea de enfermedad es más frecuente que la forma visceral; sin embargo, los signos cutáneos suelen ser en general inespecíficos y pueden estar asociados a otras alteraciones dermatológicas, por lo que es posible que subestimemos esta infección durante el chequeo clínico. Así, es recomendable llevar a cabo distintos métodos diagnósticos para diferenciar esta enfermedad de otras afecciones cutáneas (Poli, 2002).

Al igual que en el caso de la leishmaniosis canina, se usa para el diagnóstico de esta enfermedad en gatos, la visualización directa de los amastigotes de *Leishmania* spp. a partir de muestras **citológicas** o **histológicas** de las lesiones cutáneas, a partir de ganglios y quizá también de médula ósea. También se puede proceder a la inoculación en hámster o al cultivo en macrófagos bovinos, en medio de Tobbie modificado por Evans (EMTM), medio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) o medios líquidos para cultivos de células, como el RPMI, suplementados con suero fetal bovino (Walton, 1977; Evans, 1978; Craig, 1986; Laruelle-Magalon, 1996; Ozon, 1998; Morsy, 1999; Pennisi, 2002; Simoes-Mattos, 2005). También se usa la **electroforesis de isoenzimas**, para identificar la cepa de *Leishmania* spp. responsable de la infección (Cupolillo, 1994).

Como hemos mencionado con anterioridad, los hábitos de alimentación de los flebotomos incluyen al gato, por lo que el **xenodiagnóstico** podría ayudar en el diagnóstico de esta enfermedad (Pennisi, 2002; Maroli, 2007).

También se pueden usar técnicas serológicas como la **IFI** (Poli, 2002, Pennisi, 2002, da Silva, 2008), **ELISA** (Simoes- Mattos, 2005), **Inmunoblot** (Marty, 1995; Laruelle-Magalon, 1996; Ozon, 1998; Grevot, 2005; da Silva, 2007) o la contrainmunolectroforesis (**CEP**) (Tesouro, 1992b; Laruelle-Magalon, 1996). La contrainmunolectroforesis posee una sensibilidad tan buena como la de la IFI y una especificidad relativamente buena (Laruelle-Magalon, 1996). También se emplean como técnicas serológicas de diagnóstico la **hemaglutinación** directa (Ozon, 1998; Kongkaew, 2007) o indirecta (IHAT) (Morsy, 1999).

Las técnicas serológicas y el proteinograma parecen ser menos específicas en la leishmaniosis felina que en la canina (Merchant, 1995; Poli, 2002); de hecho, los gatos infectados por *Leishmania* spp. suelen desarrollar una respuesta de anticuerpos más baja o negativa, y los cambios en las proteínas séricas son menos importantes que en el caso de la leishmaniosis canina (Athias 1991; Merchant, 1995).

En ocasiones la seroconversión ocurre en la fase de resolución de las lesiones, lo que sugeriría que las técnicas serológicas no son de gran valor para detectar infección activa en gatos (Simoes-Mattos, 2005; Martín-Sánchez, 2007).

Igualmente se puede aplicar el **test de Montenegro** o leishmanina a los gatos (Barnes, 1993) o, lo que es lo mismo, la inoculación intradérmica del antígeno de *Leishmania* spp.

Del mismo modo que para las leishmaniosis caninas, en la leishmaniosis felina se usan técnicas moleculares para su diagnóstico, como la **PCR** (Passos, 1996; Poli, 2002; Savani, 2004; da Silva, 2008; Tabar, 2008). Se pueden emplear asimismo dos ciclos de PCR, uno para detectar *Leishmania* spp. y el otro para concretar la especie responsable de la infección (Poli, 2002). La PCR se puede realizar a partir de muestras obtenidas de lesiones cutáneas (Passos, 1996; Poli, 2002; Rufenacht, 2005), bazo (Savani, 2004),

aspirados ganglionares (Vita, 2005), médula ósea (Leiva, 2005) o sangre (da Silva, 2008; Tabar, 2008).

2.2.7.5 Diagnóstico diferencial de la leishmaniosis felina

Laruelle-Magalon y colaboradores hacen referencia a las posibles alteraciones a incluir en el diagnóstico diferencial cuando nos encontramos un gato con lesiones cutáneas similares a las descritas para la leishmaniosis felina. Así, incluyen en su lista de diagnósticos diferenciales a la hipersensibilidad a la picadura de pulgas, otras hipersensibilidades, ectoparasitosis, lupus eritematoso sistémico, pénfigo foliáceo, micosis fungoide, dermatitis solar, epiteloma y policondritis atrofiante crónica (Laruelle-Magalon, 1996).

Además de estas alteraciones, sería necesario incluir otras patologías que cursen con síntomas similares a los de la leishmaniosis en gatos, en especial, aquéllas que puedan producir síntomas generales, inespecíficos u oculares, entre ellos la ehrlichiosis y la bartonelosis (Leiva, 2005).

2.2.7.6 Tratamiento de la leishmaniosis felina

El tratamiento de la leishmaniosis en gatos no está aún bien definido. El **alopurinol** es bien tolerado por los gatos, pero, como ocurre en perros, no erradica la infección (Pennisi, 2002, 2004; Leiva, 2005). También se ha probado el tratamiento con **Glucantime®** y ketoconazol, con la consiguiente resolución de las lesiones cutáneas (Hervas, 1999).

Otros tratamientos probados, pero no siempre satisfactorios son: metronidazol, fluconazol, espiramicina e itraconazol (Pennisi, 2004).

2.2.8 La Leishmaniosis en España

La leishmaniosis ha adquirido mucha importancia en España, dado la expansión que ha tenido esta enfermedad en la población canina y la introducción de nuevos grupos de riesgo para la leishmaniosis humana, al incluirse esta enfermedad dentro de los programas de la OMS y CEE (Botet, 1993). En España, los casos declarados de leishmaniosis en medicina humana son menores que en la especie canina. Al año se diagnostican aproximadamente 15.000 casos de leishmaniosis canina en España (Ferrer, 1997a).

La enfermedad se describió con el nombre de kala-azar por primera vez en España en 1912 (Pittalunga, 1912) en medicina humana. Tan solo un año más tarde, en 1913, se describió el primer caso de **leishmaniosis canina** en nuestro país (Pittalunga, 1913). La aplicación de la electroforesis de isoenzimas en la caracterización de las cepas de *Leishmania* spp. en España ha permitido incriminar a *L. infantum* como agente responsable.

En el territorio nacional se han identificado 12 especies de flebotomos, de los que sólo dos han sido relacionados como vectores de *L. infantum*: *Phlebotomus perniciosus*, que se encuentra principalmente en zonas más secas, como el centro y sur de España, y *Phlebotomus ariasi*, que se localiza preferiblemente en zonas más frías, como el noreste de España (Rioux, 1986; Lucientes-Curdi, 1988; Gil Collado, 1989; Morillas, 1996).

En nuestro país se diagnostican casos de leishmaniosis canina en prácticamente todo el territorio nacional, siendo Levante y la zona centro del país las más afectadas (Tesouro, 1991). La seroprevalencia de *L. infantum* en perros en España oscila entre el 2,4% y el 34,6% (Segovia, 1985; Morillas, 1996; Fisa, 1999; Solano-Gallego, 2001a; Amusatogui, 2004; Miró, 2007; Fernández-Bellón, 2008), aunque parece ser que la seroprevalencia es mayor de lo que se informa (Berrahal, 1996; Solano-Gallego, 2001a).

En la Comunidad Autónoma de Madrid, los valores de seroprevalencia de esta enfermedad en perros han ido variando, fijándose en un 7,9% en el año 1936 (Sánchez-Botija, 1936), disminuyendo posteriormente en los años 50 a un valor en torno al 5%

(Gonzalez, 1955; Amela, 1995). En los años 80, un estudio retrospectivo pone de manifiesto un aumento de seroprevalencia, alcanzando incluso el 36% (Tesouro, 1989). En los 90 se muestran valores de seroprevalencia del 4,7% (Celaya, 1993), siendo el valor más elevado en albergues de nuestra Comunidad (Meana, 1993). En la presente década se ha descrito en Madrid una seroprevalencia del 7,8% (Miró, 2007).

En cuanto a la **leishmaniosis felina**, hemos mencionado la descripción de casos posibles de esta enfermedad en gatos de distintos países europeos de nuestro entorno, como Portugal (Costa-Durao, 1994; Maia, 2008), Francia (Laruelle-Magalon, 1996; Ozon, 1998), Italia (Pennisi, 1999; Poli, 2002) o Suiza (Rufenacht, 2005).

En **España** existen escasos estudios sobre esta enfermedad en gatos (Hervas, 1999; Leiva, 2005, Solano-Gallego, 2007; Martín-Sánchez, 2007). Algunos de éstos describen la aparición de síntomas cutáneos y viscerales de enfermedad en el gato (Hervas, 1999, Leiva, 2005), en muchos casos similares a los encontrados en el perro.

Se describen valores de seroprevalencia de *Leishmania* spp. en gatos en España que oscilan entre el 5,25% (Solano-Gallego, 2007) y el 60% (Martín-Sánchez, 2007). También se ha demostrado la presencia de ADN de *L. infantum* en el gato mediante técnicas moleculares, concretamente por PCR (Tabar, 2008; Ayllon, 2008).

En cuanto a la leishmaniasis **humana** en España, se han descrito numerosos casos, habiéndose observado, en algunos estudios, una mayor incidencia de casos en Madrid y en Castilla-La Mancha (Valcárcel, 2008), sobre todo en niños e inmunodeprimidos, aunque también se vienen observando, cada vez con más frecuencia, en personas inmunocompetentes (Pasquau, 2005; Valcárcel, 2008).

2.3 BARTONELLOSIS

2.3.1 Etiología y epidemiología

La bartonellosis es una enfermedad producida por bacterias aerobias bacilares o cocobacilares Gram negativas y hemotrópicas, que causan una bacteriemia intraeritrocítica y pertenecen a la familia *Bartonellaceae*. Antiguamente estaban incluidas dentro del orden *Rickettsiales* y posteriormente se incluyeron en el subgrupo de las *Proteobacterias* alfa-2, más próximas al género *Brucella* que al género *Rickettsia* (Birtles, 1995). Son especies catalasa, oxidasa, ureasa y nitrato reductasa negativas.

Las especies que hoy en día componen el género *Bartonella* antiguamente formaban parte de tres géneros distintos: *Bartonella*, *Rochalimaea* y *Grahamella*, que se unificaron dando lugar a un solo género: *Bartonella* (Schwartzman, 1992; Brenner, 1993; Birtles, 1995). Así, especies como *B. henselae*, *B. quintana*, *B. vinsonii*, *B. elizabethae* y *B. bacilliformis*, se incluyeron dentro de este género. Otras especies, como *B. tribocorum*, *B. washoensis*, *B. koehlerae*, *B. alsatica* y *B. bovis*, entre otras, fueron añadidas a la lista de especies de *Bartonella*. La relación filogenética entre todas ellas está basada en la secuencia del gen ARN ribosómico 16S (ARNr 16S). Actualmente existen unas 20 especies y subespecies dentro de este género, de las que al menos 14 se han implicado como productoras de enfermedad en el hombre (Vayssier-Taussat, 2008; Breitschwerdt, 2008).

El hombre y muchos animales domésticos y salvajes pueden servir como reservorios para distintas especies de *Bartonella*, entre ellos cánidos, félidos, bóvidos, équidos y roedores (Kordick, 1998; Breitschwerdt, 2000; Dehio, 2004; Jones, 2008).

Hasta 1993, el término de bartonellosis se refería sólo a la enfermedad de Carrión, descrita por Barton y colaboradores en el año 1909 y específica de la región de los Andes de Perú, Colombia y Ecuador (Bass, 1997). Esta enfermedad es debida a *B. bacilliformis*,

que produce una enfermedad vasculoproliferativa y hemolítica y produce bacteriemia persistente en el hombre.

B. quintana (antiguamente denominada *Rochalimaea quintana*) fue causante de enfermedad durante la Primera Guerra Mundial, produciendo la fiebre de las trincheras o fiebre de los 5 días (quintana) y posteriormente reemergió a finales del siglo XX como agente causal de enfermedad en vagabundos, drogodependientes y grupos desfavorecidos (Bass, 1997). Es causante, además, de angiomatosis bacilar, peliosis bacilar, endocarditis, bacteriemia persistente y linfadenomegalia crónica, sobre todo en pacientes inmunodeprimidos (Vinson, 1969; Cockerell, 1991; Koehler, 1993, 1995; Drancourt, 1996), y se transmite por medio del piojo corporal (Koehler, 1997; Brouqui, 1999, Guival, 2001).

B. henselae (antigua *Rochalimaea henselae*) se ha aislado en gatos sanos, aunque en algunos casos produce enfermedad leve en ellos y lesiones histopatológicas. Se considera al gato como el principal reservorio para esta especie. En personas, se ha asociado a diversas patologías, como la angiomatosis bacilar, peliosis hepática, bacteriemia persistente, meningitis, encefalitis, neurorretinitis, endocarditis, eritema nodoso y linfadenitis piogranulomatosa o enfermedad del arañazo del gato (cat scratch disease o CSD) (Margileth, 1988; Relman, 1990; Slater, 1990; Reed, 1992; Koehler, 1994; Gasquet, 1998). Al igual que *B. quintana*, *B. henselae* es uno de los causantes principales de endocarditis en personas. Los perros también han demostrado estar expuestos a *B. henselae* (Solano-Gallego, 2004).

B. clarridgeiae fue aislada en 1995 de un gato doméstico perteneciente a un paciente positivo a VIH (Clarridge, 1995). Se encuentra en un 10-30% de gatos sanos analizados, en muchas ocasiones conjuntamente con *B. henselae* (Kordick, 1996, 1997a; Chomel, 1999; Gurfield, 1997, 2001) e igualmente se ha detectado en perros (Chomel, 2001; Gillespie, 2003). Se ha asociado este agente con una enfermedad similar a la CSD en personas (Lawson, 1996; Kordick, 1997a) y, de hecho, se le ha implicado como agente causal de la CSD, sobre todo en aquellos casos seronegativos a *B. henselae* (Kordick, 1997a). Su papel en otras alteraciones, como la angiomatosis bacilar, es aún desconocido.

B. koehlerae y *B. bovis* (antiguamente denominada *B. weissii*) se han aislado de gatos sanos (Droz, 1999; Regnery, 2000; Chomel, 2004), aunque no se ha determinado aún su papel patógeno en esta especie. *B. koehlerae* se ha implicado también en un caso de endocarditis en medicina humana (Boulois, 2005). *B. elizabethae* (antes llamada *Rochalimaea elizabethae*) infecta ratas de forma natural (Ellis, 1999), pero también se ha hallado en personas inmunodeprimidas con endocarditis (Daly, 1993). *B. vinsonii* (antigua *Rochalimaea vinsonii*) se ha aislado únicamente en la rata de campo, si bien, *B. vinsonii* subespecie *berkhoffii* se ha hallado en perros, coyotes y personas con endocarditis (Kordick, 1996; Chang, 1999, 2000; Roux, 2000; Breitschwerdt, 2000). Existen, además, **otras especies** de *Bartonella* aisladas de ciertos mamíferos y cuyo papel patógeno en perros, gatos o personas queda aún por aclarar (Heller, 1998, 1999; Bermond, 2000, 2002; Dehio, 2001; Maillard, 2004). *B. bacilliformis* y *B. clarridgeiae* son las únicas especies flageladas, lo que facilita la invasión celular, mientras que otras especies de *Bartonella*, como *B. henselae*, carecen de dicho flagelo.

Algunos autores sostienen la existencia de una **especificidad de hospedador** por parte de las diferentes especies de *Bartonella*. Así, se piensa que *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, y *B. koehlerae* son específicas del gato, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* de perros y coyotes, *B. alsatica* de conejos y *B. quintana* de personas. Algunos intentos de infectar a otras especies animales han sido fallidos, como la ausencia de bacteriemia en el intento de infectar al perro con *B. henselae*, o al gato con *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* (Breitschwerdt, 2000). Sin embargo, otros autores afirman que los perros se pueden infectar por al menos cinco especies de *Bartonella*, como *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *B. washoensis* y *B. elizabethae* (Breitschwerdt, 1995b; Mexas, 2002; Chomel, 2001, 2003a, 2006), considerándose hospedador accidental de estas especies (Chomel, 2006), salvo en el caso de *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, del que podría ser el principal reservorio (Kordick, 1998; Breitschwerdt, 2000). En gatos y roedores también es posible la infección con más de una especie de *Bartonella* (Gurfield, 1997; Heller, 1997; Kosoy, 1997; Kordick, 1999).

Existen varias cepas genéticamente diferentes de *B. henselae*, identificándose dos genogrupos en personas y gatos según la secuencia del ARNr 16S, que son: *B. henselae* Houston-1 (o **tipo I**) y Marseille (o **tipo II**); éstos, a su vez, están divididos en cuatro variantes: de la I a la IV (Bergmans, 1996; Sander, 1997, 1998; Zeaiter, 2002; Fabbi,

2004). La prevalencia de los genotipos de *B. henselae* varía en las diferentes regiones; así, el tipo I es más prevalente en Asia (Japón y Filipinas) y el tipo II en el oeste de Europa, Australia y el oeste de Estados Unidos (Fabbi, 2004; Chomel, 2006). También varían entre las poblaciones de gatos dentro de un mismo país. Además, los dos genotipos (tipo I y tipo II) muestran diferentes serotipos y poseen modelos de proteínas distinguibles (La Scola, 2002). *B. henselae* tipo I es la causante de la mayor parte de casos de la enfermedad del arañazo del gato o “catch-scratch disease” (CSD), por lo que podría ser una cepa más virulenta que la tipo II (Boulouis, 2005).

El **hombre** es susceptible a la infección por, al menos, 10 especies y subespecies de *Bartonella*, entre ellas *B. henselae*, *B. quintana* y *B. bacilliformis*, que son las más frecuentes, y *B. clarridgeiae*, *B. vinsonii*, *B. koehlerae*, *B. grahamii*, *B. elizabethae*, *B. washoensis* y *B. alsatica*, que han sido identificadas más recientemente en el hombre (Kerkhoff, 1999; Kosoy, 2003; Johnson, 2003; Mansueto, 2003; Avidor, 2004; Raoult, 2006). Como hemos mencionado, el gato es el reservorio principal de *B. henselae* y posiblemente de *B. clarridgeiae* para el hombre. Existen estudios que muestran seroreactividad a *Bartonella* spp. en donantes de sangre sanos (Zandgwill, 1993; Jackson, 1996; Holmberg, 1999), en vagabundos (Brouqui, 1999) y en veterinarios (Noah, 1997; Nowotny, 1997).

El mecanismo de **transmisión** de las bartonellas no es del todo conocido. Parece que se produce por medio de vectores artrópodos y se han implicado a las pulgas, piojos, ácaros, flebotomos y garrapatas como potenciales transmisores de *Bartonella* spp. (García-Cáceres, 1991; Chomel, 1996b; Higgins, 1996; Foil, 1998; Roux, 1999; Billeter, 2008). Algunas especies de *Bartonella* parece que se transmiten entre los gatos por medio de **pulgas**, lo que ha sido sugerido a raíz de la detección molecular de distintas especies de *Bartonella* en estos vectores (Chomel, 1996a; Rolain, 2003b). *B. henselae*, en concreto, se puede transmitir mediante pulgas entre gatos infectados y gatos no infectados (Chomel, 1996a). Este agente se ha detectado en el intestino de las pulgas y se puede cultivar a partir de sus heces (Higgins, 1996), pudiendo infectarse los gatos por medio de la inoculación intradérmica de heces de estos vectores (Foil, 1998). La transmisión de *B. henselae* de los gatos a las personas parece ser por la contaminación de las garras o los dientes con heces de la pulga infectada y el posterior arañazo o mordedura por parte del gato (Fabbi, 2004).

B. quintana se transmite a los humanos por contacto de lesiones en la piel o de la conjuntiva con las heces de las pulgas infectadas (Breitschwerdt, 2000).

También se ha asociado con la transmisión de la bartonelosis, el **piojo** del cuerpo denominado *Pediculus humanus*, sobre todo en las clases más desfavorecidas (Brouqui, 1999). Parece que las **garrapatas** podrían jugar un papel en la transmisión de algunas especies de *Bartonella*, aunque aún no ha sido probado, si bien se han aislado especies de *Bartonella* en varias especies de garrapatas (Hofmeister, 1998; Schouls, 1999; Chang, 2001, 2002; Morozova, 2004). Además, ciertos **mosquitos** han demostrado estar infectados por *Bartonella* spp. lo que podría implicarlos en la transmisión de estos agentes (Chung, 2004). En medios libres de ectoparásitos no se produce transmisión de *Bartonella* spp., lo que implica así a estos vectores como potenciales transmisores (Chomel, 1996). La eliminación de las garrapatas y pulgas de los animales y el entorno interrumpe el ciclo de transmisión (Birtles, 1994).

También es posible su transmisión por medio de **transfusiones sanguíneas**, como se ha demostrado experimentalmente (Kordick, 1999; Reine, 2004). Además, en roedores se ha constatado la posibilidad de transmisión **transplacentaria** (Kosoy, 1998), si bien en algunos estudios experimentales no se ha producido la transmisión perinatal o transplacentaria (Guptil, 1998). Dado el elevado porcentaje de conejos, ciervos y ganado de carne bacteriémicos, se ha postulado la posibilidad de transmisión a través del **procesado de la carne** (Breitschwerdt, 2000).

2.3.2 Patogenia

En cuanto al mecanismo patogénico de la infección por *Bartonella* spp., a pesar de los avances obtenidos, aún quedan muchas cosas por aclarar. Se conoce que una vez que el agente es inoculado en el organismo, *Bartonella* spp. invade los **eritrocitos** (Kordick, 1995; Rolain, 2001; Schulein, 2001), lo que le hace persistir en el torrente sanguíneo de su hospedador, provocando una bacteriemia. El mecanismo de entrada en los eritrocitos es aún desconocido, aunque parece que la membrana eritrocitaria engloba a la bacteria y se produce una endocitosis inducida por la bacteria (Benson, 1986; Kordick, 1995; Dehio,

2004). También puede encontrarse en las células endoteliales vasculares, como se ha observado en roedores (Dehio, 2001a), provocando una angiogénesis y con ello lesiones vasoproliferativas (Dehio, 2004). No se conoce con exactitud el mecanismo por el que las bartonellas producen **angiogénesis**. Una hipótesis es que las bartonellas, cuando se adhieren o son fagocitadas por los macrófagos, provocan la secreción por parte de éstos de un factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), que conduce a la proliferación de las células endoteliales y la angiogénesis, produciéndose con ello una vasoproliferación (Resto-Ruiz, 2003; Dehio, 2004). Otra hipótesis sostiene la provocación directa por parte de *Bartonella* spp. de una proliferación y apoptosis de las células endoteliales, produciéndose un aumento de la angiogénesis (Dehio, 2003). Parece que este agente es capaz de infectar los precursores de células sanguíneas en la médula ósea, lo que lleva a su presentación intracelular y replicación en las mismas (Mandle, 2005). La ubicación de las bartonellas dentro de las células, tanto del torrente sanguíneo como de sus precursoras en médula ósea, posibilita el mantenimiento en el hospedador para su posterior transmisión, las protege del sistema inmunitario del hospedador, facilita su dispersión por el organismo y contribuye a la disminución de la eficacia de los tratamientos frente a este agente (Dehio, 2001a; Rolain, 2001, 2002).

2.3.3 Enfermedad del arañazo del gato (CSD)

Esta enfermedad se describió en el hombre en la década de los 50 (Debre, 1950, Mollaret, 1950), y en un primer momento se involucró a *Afipia felis* (Brenner, 1991), aunque posteriormente se aisló otro agente como responsable de la enfermedad, que se denominó *Rochalimaea henselae*, que más adelante pasó a llamarse *Bartonella henselae* (Regnery, 1992a; Welch, 1992). Posteriormente se vio que los pacientes con CSD eran seropositivos a *B. henselae* y seronegativos a *A. felis* y además se ha detectado el ADN del primer agente y no del segundo en muestras de estos pacientes con CSD (Regnery, 1992b; Szelc-Kelly, 1995); por tanto, el papel de *A. felis* en la producción de CSD no está claro, si bien todos los datos apuntan a que *B. henselae* es el responsable de esta enfermedad. Ello viene apoyado por varios estudios, como los que asocian el aumento de anticuerpos frente a este agente en personas con sospecha de CSD en comparación con personas sin CSD (Regnery, 1992a, 1992b; Zangwill, 1993; Amerein, 1996), los que detectan *B. henselae*

mediante PCR en linfonódulos de pacientes con CSD (Anderson, 1994), o los que observan que los gatos que conviven con personas que padecen CSD son en su mayoría bacteriémicos (Breitschwerdt, 2008). El CSD afecta a más de 22.000 personas en Estados Unidos cada año. Se puede presentar en individuos de todas las edades y, aunque la incidencia es mayor en niños o jóvenes de menos de 21 años (Maguina, 2000; Massei, 2003; Arvand, 2006), también se ha descrito en adultos (Manfredi, 2006).

Se han implicado otros agentes en la producción de la CSD, como *B. quintana*, dado que existía seroreactividad frente a este agente en pacientes con CSD, y *B. clarridgeiae*, aislada de un gato perteneciente a un paciente bacteriémico con VIH, aunque no se ha detectado su DNA en los pacientes afectados (Clarridge, 1995; Lawson, 1996; Kordick, 1997a; Boulois, 2005).

El gato es el reservorio principal de este agente para el hombre (Regnery, 1992a; Koehler, 1994). Se piensa que transmite la enfermedad al hombre directamente (por medio de arañazos o mordeduras) o indirectamente (a través de sus pulgas). Un elevado porcentaje de casos con CSD confirman haber tenido contacto previo con gatos (Manfredi, 2006; Breitschwerdt, 2007). También se ha implicado al perro en su transmisión al hombre (Keret, 1998; Tsukahara, 1998).

La CSD se define como una enfermedad **benigna**, **autolimitante** y **leve** caracterizada por fiebre y linfadenopatía, ésta última localizada sobre todo próxima al punto de inoculación (Kordick, 1997a; Massei, 2004). En dicho punto de inoculación suele aparecer una pápula rojo-marronácea a los 7-12 días de la infección (Kravetz, 2002; Arvand, 2006). En la mayoría de los pacientes la linfadenopatía engloba a un sólo linfonódulo, sobre todo en las extremidades superiores, axila o cuello. La afección de múltiples nódulos sugiere la diseminación del agente por el organismo (Margileth, 1993; Hopkins, 1996). Esta diseminación puede producir síntomas no sólo en vísceras sino también en huesos (Larsen, 1992; Hopkins, 1996). Así, manifestaciones consideradas como **atípicas** de la enfermedad incluyen alteraciones neurológicas, oculares (incluidos en el síndrome oculo-glandular de Parinaud), endocarditis, problemas músculo-esqueléticos y patologías del hígado, bazo, riñón y piel, entre otras (Parinaud, 1889; Landau, 1999; Rolain, 2003; Martínez-Osorio, 2005; Family-Pigne, 2006; Liao, 2006; Maman, 2008; van der Veer-Meerkerk, 2008). Aunque la sintomatología de la CSD es típicamente benigna, en

personas inmunodeprimidas puede ser más grave (Groves, 1994). De todas maneras, en unos 3 meses suele resolverse por sí misma, aunque se han descrito casos en los que no se ha producido la resolución hasta los 2 años (Maguina, 2000).

Algunos autores consideran que ante una infección de las características anteriormente descritas, se deberían descartar, en medicina humana, ciertas patologías, como por ejemplo las que cursan con signos cutáneos similares a la angiomatosis bacilar, como el sarcoma de Kaposi, granuloma piogénico y la leishmaniosis, además de la enfermedad de Kimura, angioblastoma, angiosarcoma, angioqueratoma, dermatofibroma y el angioma rubí (Kaplan, 1987).

2.3.4 Bartonellosis en el gato

2.3.4.1 Etiología y epidemiología

Se ha constatado la exposición a *Bartonella* spp. del gato y de felinos salvajes, como panteras, pumas, leones africanos o linceos (Chomel, 2004; Molia, 2004). Dentro de los felinos, es especialmente importante el papel del gato doméstico, por su proximidad con el hombre.

En el gato, la primera descripción de infección por *B. henselae* data de 1992 (Regnery, 1992b). Desde entonces, se ha constatado que esta especie, junto con *B. clarridgeiae*, *B. koehlerae* y *B. bovis*, puede infectar naturalmente al gato (Koehler, 1994; Lawson, 1996; Droz, 1999; Regnery, 2000; Chomel, 2004).

Como hemos comentado, se cree que *B. henselae* se transmite, entre gatos infectados y no infectados, por medio de **pulgas**, concretamente por la especie *Ctenocephalides felis* (Chomel, 1996a; Foil, 1998). Además, se ha observado este agente en el intestino de las pulgas y se puede cultivar a partir de heces de la misma (Higgins, 1996). La ruta de transmisión más probable entre gatos es por inoculación intradérmica de heces de pulgas contaminadas (Foil, 1998; Finkelstein, 2002). Esta afirmación viene reforzada además por el hecho de que no se produce transmisión de *B. henselae* desde los

gatos infectados a los no infectados si no hay pulgas en el ambiente, como se ha demostrado en algunos estudios (Abbott, 1997), lo que indica que la transmisión entre gatos no se produce mediante mordeduras, arañazos, acicalado o compartir comederos o bebederos. Parece que este agente no se transmite vía perinatal o en el apareamiento (Abbott, 1997; Guptill, 1998).

Como ya se ha reseñado, los gatos constituyen el principal reservorio de *B. henselae* y *B. clarridgeae* para los humanos. La transmisión de *B. henselae* de los gatos a las personas se puede producir a partir de los arañazos o mordeduras contaminadas de gato o a través de sus pulgas (Chomel, 2000). Parece que los gatos de menos de 1 año se encuentran infectados con mayor frecuencia (Dalton, 1995) e igualmente, en una misma región, los gatos callejeros suelen estar más infectados que los domésticos (Childs, 1994, 1995; Chomel, 1995, 1996a; Ferres, 2005). Se ha observado que los valores elevados de seroprevalencia en gatos de gateras están asociados con una elevada infestación por pulgas (Foley, 1998).

Al igual que para otras enfermedades, es probable la **infección conjunta** de un gato por varios organismos del mismo género o de géneros distintos. Así, se puede dar la coinfección entre varias especies de *Bartonella* en el mismo animal (Gurfield, 1997, 2001; Chomel, 1999; Kordick, 1996) o con otras especies pertenecientes a otros géneros, como especies de *Ehrlichia* y *Babesia* (Pappalardo, 1997; Breitschwerdt, 1998b; Kordick, 1999).

En zonas donde las pulgas son endémicas, un elevado porcentaje de gatos infectados permanecen **bacteriémicos** durante un tiempo prolongado tras la infección (Jameson, 1995; Kordick, 1995, 1999; Regnery, 1996; Heller, 1997), es decir, portan *Bartonella* spp. en el organismo, pero permanecen asintomáticos. El establecimiento de una asociación entre la producción de una sintomatología clínica y la bacteriemia requiere de más estudios.

Es muy importante determinar la existencia de bacteriemia en un gato, ya que los gatos bacteriémicos suponen un riesgo de transmisión para el hombre (Kordick, 1995b). El **cultivo** del agente a partir de sangre es un buen método para identificar a los gatos bacteriémicos. *Bartonella* spp. se ha aislado de sangre de gatos en distintos países, como Estados Unidos (Koehler, 1994; Keret, 1998), Japón (Maruyama, 1996), Australia

(Flexman, 1995), Nueva Zelanda (Joseph, 1997), Países Bajos (Bergmans, 1997), Indonesia (Marston, 1999), Alemania (Sander, 1997), Francia (Heller, 1997) y España (Pons, 2005)

La mayoría de los estudios **serológicos** sobre *Bartonella* spp. se han realizado en gatos y muestran que un elevado número de ellos se encuentran expuestos a los miembros de esta especie en muchos países el mundo (Childs, 1994, 1995; Chomel, 1995; Jameson, 1995; Ueno, 1995; Glaus, 1997; Foley, 1998; Ferres, 2005). Los valores de seroprevalencia parecen estar influidos por el **clima** y han mostrado ser más elevados en zonas cálidas y húmedas, en las que se espera una mayor infestación por pulgas (Jameson, 1995). En Estados Unidos los valores de seroprevalencia son variables según las distintas regiones del país, encontrándose tasas que varían del 3,7% al 54,6%, observándose los valores más bajos en las Montañas Rocosas (Jameson, 1995). En otros países, los valores de seroprevalencia de *Bartonella* spp. en gatos también son muy variables. Así, por ejemplo tenemos valores del 0% en Noruega (Bergh, 2002), 7% en Portugal (Childs, 1995), 8% en Suiza (Glaus, 1997), 11% en Egipto (Childs, 1995), 7% y 15% en Japón (Ueno, 1995; Maruyama, 2000c), 21% en Sudafrica (Kelly, 1996), 24% en Zimbabwe (Kelly, 1996), 29,6% en España (Pons, 2005), 38% en Italia (Fabbi, 2004), 40% en Israel (Baneth, 1996), 41% en Francia (Gurfild, 2001), 47% en Hawái (Demers, 1995), 48% en Singapur (Nasirudeen, 1999), 54% en Indonesia (Marston, 1999), 56% en los Países Bajos (Bergmans, 1997), 68% en Filipinas (Boulois, 2005) y 81% en California (Chomel, 1995).

2.3.4.2 Patogenia

El elevado número de animales bacteriémicos durante períodos de tiempo prolongados (incluso durante un año) lleva a pensar en el carácter **persistente** de estas infecciones (Sander, 1997), si bien Arvand y colaboradores, sugieren la posibilidad de una **reinfección** por una cepa diferente, al observar en dos gatos que la cepa de *B. henselae* infectante era distinta al inicio del estudio que 12 meses después, y sugieren el empleo de la tipificación molecular para poder diferenciar entre recaída y reinfección (Arvand, 2008). Diversos estudios experimentales indican que la bacteriemia puede resolverse espontáneamente a las 22-33 semanas post-infección (Guptill, 1997; O'Reilly, 1999;

Yamamoto, 2002), si bien en algunos casos se mantiene durante períodos mayores, hasta de más de 7 meses (Guptill, 1997).

Parece que el **sistema inmunitario** del animal influye en el curso de la infección y con ello de la bacteriemia y, así, puede contribuir a establecer las recaídas y la cronicidad de la infección (Kabeya, 2006). El sistema inmunitario de tipo humoral y celular puede contribuir en actividades bactericidas (Rodríguez-Barradas, 1995), ayudando en la eliminación del agente. *B. henselae* induce la producción de interleucina-4 (IL-4) por los linfocitos, lo que resulta en una estimulación del sistema inmunitario humoral y, con ello, en la producción de anticuerpos, que podrían contribuir a la eliminación, aunque no total, de las bartonellas del gato (Kabeya, 2006). La infección por *Bartonella* spp. **no protege** frente a una nueva infección y, como hemos mencionado anteriormente, la posibilidad de reinfecciones podría depender de la cepa infectante o especie de *Bartonella* involucrada. Así, si el animal es infectado, por ejemplo, por *B. henselae* tipo II, es susceptible de infectarse por el tipo I (Yamamoto, 1997). Igualmente los gatos infectados por una especie de *Bartonella* pueden ser re infectados por otra especie distinta (Yamamoto, 2003; Arvand, 2008). No obstante, algunos autores han observado en estudios experimentales que gatos previamente infectados permanecen abacteriémicos al intentar una nueva infección, siendo por tanto inmunes a la reinfección (Regnery, 1996).

El estrés u otros factores como la infección por virus inmunosupresores (FeLV o FIV) podrían ser factores predisponentes y agravantes del cuadro. No obstante, algunos estudios no observan una asociación entre la infección por *Bartonella* spp. y la presencia de virus inmunosupresores (FeLV/FIV) en el animal (Solano-Gallego, 2006b). Sin embargo, otros autores observan una influencia de estas virosis en la incidencia de linfadenopatía y gingivitis en gatos infectados por *Bartonella* spp. (Ueno, 1996). Por otro lado, estudios experimentales han mostrado que la cepa de *B. henselae* infectante podría también influir en la gravedad de los síntomas (Ueno, 1996; Guptill, 1997; Kordick, 1999b; O'Reilly, 1999).

2.3.4.3 Cuadro clínico y hallazgos laboratoriales

La mayoría de los gatos infectados por *Bartonella* spp. permanecen **asintomáticos**, incluso tras la infección experimental (Koehler, 1994; Regnery, 1996; Brunt, 2006). Sin embargo, la infección por *B. henselae* en gatos se ha asociado con ciertas manifestaciones clínicas, como fiebre, letargia, anorexia, linfadenopatía, uveítis, gingivitis, estomatitis, alteraciones neurológicas (nistagmo, temblores, letargia, etc), alteraciones del aparato urinario y cardíacas, fallos reproductivos (reabsorción fetal, problemas en la concepción, etc) y mialgias (Kirkpatrick, 1989; Dalton, 1995; Glaus, 1997; Guptill, 1997, 1998; Kordick 1999b; Lappin, 1999; O'Reilly, 1999; Chomel, 2003b). A pesar de todo lo expuesto, los signos clínicos son, en general, de carácter leve y transitorios.

En la analítica sanguínea, en algunos casos se ha observado una anemia moderada y eosinofilia transitoria (Kordick, 1999b). En algún otro caso se ha observado neutrofilia (Guptill, 1997).

2.3.4.4 Diagnóstico de las bartonelosis en el gato

Dada la naturaleza leve y transitoria de los signos clínicos que produce *Bartonella* spp. en algunos gatos, tan sólo con este dato es muy difícil el diagnóstico, sobre todo teniendo en cuenta que la mayoría de los gatos permanecen asintomáticos.

Antiguamente se empleaba el test intradérmico de **Hangar-Rose**, a partir de secreción purulenta aspirada de un linfonódulo de un paciente con CSD. Esta técnica está basada en el desarrollo de una hipersensibilidad retardada en 48-96 horas post-inoculación del antígeno, aunque no estaba estandarizada ni era empleada rutinariamente (Carithers, 1985).

La detección **citológica** de bartonellas en eritrocitos no es fácil mediante métodos de tinción convencionales. Para la visualización de estos agentes se han empleado microscopios electrónicos y de láser confocales (Kordick, 1995; Mehock, 1998). También se ha usado la tinción de plata de Warthin-Starry, a partir de linfonódulos, si bien es una

tinción difícil de realizar (Wear, 1983) y otro tipo de tinciones, como la de Gram o la de Giménez (Clarridge, 1995; Bruneval, 2001). En otros casos se han empleado métodos de fluorescencia para la visualización de estos agentes intraeritrocíticamente (Rolain, 2004). Del mismo modo se han utilizado técnicas inmunohistoquímicas e inmunocitoquímicas para la visualización de formas extracelulares de *B. henselae* en sangre periférica y otros tejidos (Guptill, 2000). Las lesiones patológicas sugerentes de infección por *Bartonella* spp. incluyen la formación de un granuloma con microabscesos e hiperplasia folicular (Carithers, 1985; Anderson, 1997).

El diagnóstico definitivo de la infección por *Bartonella* spp. se confirmaría mediante el **cultivo** del agente a partir de sangre o tejidos, como los linfonódulos o las válvulas cardíacas (Koehler, 1992; Anderson, 1994; Clarridge, 1995; Kordick, 1997a). El aislamiento de bartonellas a partir de sangre es más eficiente si se emplean métodos de lisis previa de eritrocitos y células blancas (Regnery, 1992a; Sander, 1998), o bien mediante la congelación previa de la muestra a -70°C durante 24 horas. Las bartonellas se pueden cultivar satisfactoriamente en placas agar con un 5% de sangre desfibrinada de conejo u oveja, a una temperatura de 35-37°C, en cámara húmeda con un 5% de CO₂. Aunque el crecimiento de las bartonellas es lento, tras largos períodos de incubación se pueden apreciar colonias (10-56 días post-cultivo) (Breitschwerdt, 2008). Algunos autores sostienen un mejor crecimiento de las bartonellas si, previo al cultivo en placa, se pre-enriquecen al menos 7 días con un medio de cultivo líquido conocido como BAPGM (Maggi, 2005a; Duncan, 2007; Cadenas, 2007). El crecimiento de las distintas especies es diverso y característico, siendo *B. henselae* y *B. quintana* de un crecimiento más lento y de colonias más pequeñas que *B. elizabethae* y *B. vinsonii* (Clarridge, 1995). Parece que existe una variación en el crecimiento de las bartonellas según la procedencia animal, y así, Breitschwerdt y colaboradores demuestran un crecimiento satisfactorio de *B. henselae* de sangre de gato, mientras que el aislamiento de *B. vinsonii* subspp. *berkhoffii* de esta especie animal es raramente satisfactorio (Breitschwerdt, 2000).

También se emplean las técnicas **serológicas** para el diagnóstico de *Bartonella* spp., indicando si existe exposición al agente o no. Así, las técnicas de IFI y ELISA son comúnmente empleadas para detectar la respuesta inmunitaria frente a *Bartonella* spp. (Dalton, 1995; Zbinden, 1995; Amerein, 1996; Giladi, 2001; Pons, 2005). El punto de corte de las técnicas serológicas para determinar si un gato está infectado no está

establecido, aunque muchos autores lo fijan en 1:64 (Dalton, 1995; Amerein, 1996; Solano-Gallego, 2006b; Breitschwerdt, 2007). En esta técnica se emplean como antígeno cultivos de *Bartonella* spp. con los que reaccionarán los anticuerpos del animal en el caso de que se produzca una respuesta inmunitaria (Dalton, 1995). El empleo de las células **Vero** como sustrato donde crecen las bartonellas, que se sitúan intracelularmente, es muy utilizado para su empleo como antígeno para la técnica de IFI (Zbinden, 1995; Kordick, 1997a) y parece ser más específico y sensible comparado con otros antígenos derivados del agar (Agan, 2002). Además de las células Vero, también se han empleado otros medios de cultivo de *Bartonella* spp. en líneas celulares del tipo de las células endoteliales L929 o bien las HeLa en las que el crecimiento es más rápido que en el cultivo en placas (La Scola, 1999). Mediante estas técnicas se puede detectar el nivel de Ig G y/o Ig M (Maruyama, 2000c, 2000b; Massei, 2004). Los títulos aumentan al poco tiempo de la infección, como muestran estudios experimentales, permaneciendo mantenidos durante la bacteriemia e incluso cuando ésta disminuye (Regnery, 1996) y manteniéndose la seropositividad en algunos casos durante mucho tiempo.

El **Western blot** se ha empleado en gatos, pero existen variaciones en los resultados y, como se ha observado en medicina humana, la respuesta serológica medida por esta técnica varía de un paciente a otro (Sander, 2001).

Como hemos mencionado para los otros agentes, son posibles las **reacciones cruzadas** entre las distintas especies de *Bartonella* (Childs, 1994, 1995; Baneth, 1996; Gurfield, 1997), así como con otros agentes, como los micoplasmas hemotrópicos (*Mycoplasma haemominutum*) (Lappin, 2003a), *Clamidia* o *Coxiella* (Maurin, 1997).

Algunas limitaciones diagnósticas de estas técnicas son la imposibilidad de cultivar el agente en animales seropositivos, lo que podría indicar un bajo nivel de bacterias en sangre, o la obtención de serologías negativas en casos bacteriémicos (Chomel, 1996b; Pretorius, 1999). No obstante, algunos autores encuentran una asociación entre un nivel elevado de anticuerpos y la bacteriemia (Yamamoto, 2003; Breitschwerdt, 2008).

Para la identificación de especies, se emplean diversos métodos como el análisis del perfil de ácidos grasos (CFA), el test RapID ANA y métodos moleculares (Clarridge, 1995; Kordick, 1997a). El CFA consiste en la extracción de los ácidos grasos a partir de

cultivos de *Bartonella* spp., método que sirve para la identificación de bartonellas, puesto que cada especie tiene un perfil CFA característico (Regnery, 1992; Daly, 1993; Welch, 1993). El RapID ANA es una prueba bioquímica cualitativa, basada en la degradación microbiana de sustratos específicos, detectado por varios sistemas indicadores colorimétricos. Se emplea para la detección de bacterias anaerobias, pero también se ha empleado en estudios sobre *Bartonella* spp.

Los métodos **moleculares**, habitualmente la PCR, se utilizan a partir de sangre o tejidos (Walls, 2006) en el diagnóstico de las bartonelosis. Se busca la amplificación de distintos genes, como los genes de la citrato-sintasa (gltA), de la fracción 16S del ARN ribosómico, el gen de la riboflavin-sintasa (ribC), las proteínas de choque térmico (groESL), el gen que codifica para proteínas de la división celular (ftsZ), el gen que codifica para la subunidad beta de la ARN polimerasa (RpoB), los genes de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (gdh), así como el espacio intergénico entre las porciones 16S-23S del gen ARNr (ITS), entre otros (Marullo, 1992; Anderson, 1994; Clarridge, 1995; Kordick, 1997a; Jensen, 2000; Maruyama, 2000c; Tapp, 2001; Maggi, 2005c, 2005b; Solano-Gallego, 2006b; Breitschwerdt, 2007). Esta técnica, como hemos descrito con anterioridad, ofrece una elevada sensibilidad y especificidad y sirve para diferenciar distintas especies de *Bartonella* molecularmente. Algunos autores piensan también que la variación de la PCR conocida como nested-PCR o PCR anidada puede aumentar la sensibilidad de detección de ADN de *Bartonella* spp. (Roy, 2001). Algunas limitaciones de la técnica son: la falta de estandarización entre laboratorios, la posibilidad de contaminaciones en el procesado o la persistente detección de ADN del organismo incluso tras el tratamiento (Lang, 2004; Naber, 2007).

En la especie felina, el diagnóstico diferencial debe incluir infecciones por otros agentes que igualmente parasitan los hematíes, como *Mycoplasma haemominutum*, que, además, se ha detectado también en pulgas (Lappin, 2006).

2.3.4.5 Tratamiento de las bartonellosis

Ningún protocolo antibiótico ha probado ser completamente efectivo en la eliminación de estos agentes (Greene, 1996; Regnery, 1996; Kordick, 1997b). Distintos antibióticos como la doxiciclina, enrofloxacin, rifampicina y azitromicina, se han empleado en el tratamiento de estas infecciones en gatos. Aunque pueden limitar la bacteriemia, en general no curan la infección en todos los casos, siendo necesario realizar estudios con un mayor seguimiento de los animales tras el tratamiento.

La **doxiciclina** ha mostrado eliminar la bacteriemia en algunos casos a dosis de 4-12 mg/kg vía oral cada 12 horas, tratados durante 2 semanas (Kordick, 1997b). En estudios experimentales es eficaz a dosis de 10 mg/kg, cada 12 horas, dosis similar a la empleada para la infección por *E. canis* en perros (Greene, 1997).

En algunos estudios se ha observado la eliminación de *B. henselae* y *B. clarridgeiae* empleando **enrofloxacin** a dosis de 5,4-7,6 mg/kg vía oral cada 12 horas, durante 2-4 semanas, pero se ha visto que dosis mayores de 5 mg/kg puede causar degeneración de la retina en gatos (Kordick, 1997b; Wiebe, 2002).

La **rifampicina** sola o combinada con doxiciclina también ha mostrado cierta efectividad frente a *B. henselae* en estudios experimentales (Greene, 1997), aunque algunas especies de *Bartonella*, como *B. quintana*, han mostrado ser resistentes a este fármaco en algunos estudios (Biswas, 2008)

También se ha empleado la **azitromicina** en animales seropositivos con uveítis (Hardy, 2004; Ketrin, 2004) y con gingivitis y estomatitis (Hardy, 2004), aunque la información sobre su eficacia es aún escasa. Este antibiótico ha mostrado también tener propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias, además de su efecto antibacteriano (Labro, 2001; Culic, 2002; Ortega, 2004). Se emplea a dosis de 10 mg/kg VO, cada 24 horas (Guptill, 2006).

Algunos estudios han probado la eficacia de la **claritromicina** frente a algunas especies de *Bartonella*, encontrando una buena actividad frente a *B. henselae*, *B. quintana* y *B. elizabethae* (Ives, 2000).

También se han observado mejorías del estado clínico y disminución de la bacteriemia empleando **otros fármacos**, como tetraciclina, eritromicina, penicilina, gentamicina, ceftriaxona, ciprofloxacina y amoxicilina-clavulánico, entre otros, aunque no está probada su eficacia y en algunos casos aparecen resistencias (Regnery, 1996; Guptill, 2006; Breitschwerdt, 2008).

En Estados Unidos, ante un gato clínicamente enfermo de bartonelosis, algunos autores recomiendan, como primera elección, el tratamiento con doxiciclina a dosis de 10 mg/kg/24horas, durante 28 días y, si el animal no mejora, cambiar el antibiótico (Lappin, 2006).

El tratamiento de gatos sanos con antibióticos puede llevar a la aparición de resistencias por parte del agente, como hemos mencionado anteriormente, por lo que se recomienda tratar sólo a los animales que muestran signos compatibles con bartonelosis o cuando la eutanasia es la única alternativa (Kordick, 1997b).

De todas maneras, en muchos casos se produce la resolución espontánea de la enfermedad, entre unos meses y unos años posteriores a la infección (Margileth, 1993), por lo que no están tan claras las pautas de instauración del tratamiento.

2.3.5 Prevención y consideraciones de salud pública de las bartonelosis

Las bartonelosis, como hemos visto, son enfermedades **zoonóticas**. Teniendo en cuenta la cantidad de animales que pueden actuar como reservorios de estos agentes, dada su persistente y elevada bacteriemia, y la cantidad de vectores que se han implicado en su transmisión, la exposición del hombre a estos agentes podría ser mayor de la que se piensa.

La transmisión de las bartonellas del gato al hombre se suele llevar a cabo a través de los arañazos y mordeduras o a través de sus pulgas. Para prevenir estas infecciones se debe evitar la exposición a gatos infectados por *Bartonella* spp. y las infestaciones por pulgas (con antiparasitarios externos), sobre todo en los animales domésticos que viven con el hombre. Dado el posible papel de las garrapatas en la transmisión de las bartonellas, sería conveniente proteger a los animales también frente a éstas. Para prevenir la infección por *B. quintana*, es suficiente con una higiene general, para la eliminación del piojo del cuerpo (Blanco, 2005).

Dado que esta enfermedad se podría transmitir por transfusión sanguínea, se debe controlar en la sangre donante la posible presencia de estos agentes (Reine, 2004).

Hemos visto que *B. henselae* está asociada con ciertas patologías en medicina humana, como la enfermedad del arañazo del gato o CSD antes mencionada. Las personas inmunocomprometidas padecen formas más graves de enfermedad y con peor pronóstico. Por tanto, es necesario explicar a los propietarios de gatos que *Bartonella* spp. se puede transmitir de las mascotas a los dueños, tanto por medio de arañazos y mordeduras como por medio de vectores y, con ello, la importancia de luchar contra éstos últimos, así como de tratar de evitar estas mordeduras y arañazos o, en su caso, desinfectarlas correctamente (Blanco, 2005).

El Servicio de Salud Pública de Estados Unidos/Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas o “United Status Public Health Service/Infectious Diseases Society of America” (USPHS/IDSA), así como el “Center of Disease Control” (CDC) y la “American Association of Feline Practitioners” (AAFP), recomiendan adquirir gatos en las mejores condiciones posibles, sobre todo si tienen menos de un año, mantenerlos libres de parásitos, en especial pulgas y garrapatas, evitar arañazos y mordeduras en la medida de lo posible y, si se producen, desinfectarlos rápidamente (Lappin, 2006b). No parece aportar ningún beneficio someter a los gatos o sus dueños a un cultivo o prueba serológica rutinarios frente a infecciones por *Bartonella* spp.

En este caso tampoco existe una vacuna eficaz contra la infección por *Bartonella* spp. hasta la fecha.

2.3.6 Bartonellosis en España

En España se presentan casos, aunque escasos en la literatura, de bartonellosis **humana**, sobre todo en personas inmunocomprometidas (Blanco, 1999; Pons, 2008a), aunque también en inmunocompetentes (Sanfeliu, 2008). Existen algunos casos descritos de endocarditis por *B. henselae* en medicina humana, asociados a un contacto previo con gatos (Cilla, 2001; Oteo, 2006) y un caso de iridociclitis recurrente bilateral como manifestación atípica de una CSD, en la que también existió contacto previo con gatos (Martinez-Osorio, 2005). Además hay casos descritos en España de bartonellosis en personas que presentan manifestaciones atípicas de la enfermedad (Sanfeliu, 2008). Distintos estudios serológicos muestran un elevado porcentaje de personas sanas que han tenido contacto con *Bartonella* spp., sugiriéndose que la mayoría de infecciones por estas especies pueden ser subclínicas (Garcia-Garcia, 2005; Pons, 2008b).

En cuanto al **gato**, hemos comentado cómo diversos estudios demuestran un contacto del gato con *Bartonella* spp. en distintos países del mundo (Chomel, 1995; Demers, 1995; Baneth, 1995; Childs, 1995; Ueno, 1995; Kelly, 1996; Glaus, 1997; Bergmans, 1997; Marston, 1999; Nasirudeen, 1999; Gurfield, 2001; Bergh, 2002). En **España** también se ha constatado dicha seropositividad en gatos, obteniéndose valores relativamente elevados de seroprevalencia, que sugieren un contacto con *B. henselae*, como el 29,6% descrito por Pons y colaboradores en Cataluña (Pons, 2005). El valor más elevado de seroprevalencia en toda Europa es el encontrado por Solano-Gallego y colaboradores en gatos de Cataluña y Baleares, alcanzándose el 71,4% de animales positivos (Solano-Gallego, 2006b). Solano-Gallego y colaboradores sugieren que dichas diferencias en la seroprevalencia de estos dos estudios realizados en España pueden ser debidas a las diferencias de la técnica de IFI empleada entre laboratorios, al distinto período de recogida de muestras y a diferencias demográficas en cuanto a gatos urbanos *versus* periurbanos (Solano-Gallego, 2006b).

Existen estudios que han detectado molecularmente a *B. henselae* y *B. clarridgeiae* en pulgas de la especie *C. felis* en España, lo que implicaría, como hemos comentado con

anterioridad, a la pulga como potencial transmisor de estos agentes en nuestro país (Blanco, 2006).

Además, *B. henselae* se ha aislado mediante cultivo a partir de sangre de gatos en España (Pons, 2005). También se ha detectado ADN de *B. henselae* en 7 gatos y, por primera vez en nuestro país, de *B. clarridgeiae* en un gato en Cataluña (Solano-Gallego, 2006b). Todos estos animales eran seropositivos a *B. henselae* y *B. clarridgeiae*, respectivamente, y algunos de estos animales bacteriémicos presentaban signos clínicos, sin que parezca que haya una asociación entre dichos signos clínicos y la positividad a estos agentes (Solano-Gallego, 2006b). *B. clarridgeiae* ha sido identificada de nuevo un año más tarde en otro gato en Cataluña (Tabar, 2008).

3 OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

- Conocer la seroprevalencia frente a *E. canis*, *A. phagocytophilum*, *N. risticii*, *L. infantum* y *B. henselae* en una muestra representativa de gatos de la Comunidad de Madrid, tanto en animales procedentes de clínica como en gatos callejeros.
- Detectar la presencia de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Neorickettsia* spp., *Leishmania* spp. y *Bartonella* spp. en muestras de sangre procedentes de los gatos del estudio, mediante métodos moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Aislar, por medio de cultivos en líneas celulares específicas, los agentes de interés, algunos de ellos no aislados hasta la fecha.
- Evaluar la existencia de concurrencias entre varios de los agentes incluidos en el estudio.
- Analizar la asociación entre la prevalencia frente a estos agentes y diferentes variables clínicas, analíticas y ambientales.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 PLAN DE TRABAJO

Con el fin de alcanzar los objetivos expuestos con anterioridad, y para facilitar su comprensión, englobamos el presente trabajo en varios bloques.

En primer lugar, fue necesario recopilar toda la información posible acerca del animal, y, para ello, se procedió a realizar una exploración clínica y una analítica sanguínea, así como a obtener información concerniente al hábitat y formas de vida del animal por parte del dueño, siempre que fue posible.

En segundo lugar, nos interesaba conocer la seroprevalencia de los cinco agentes incluidos en el estudio, que son *E. canis*, *A. phagocytophilum*, *N. risticii*, *L. infantum* y *B. henselae*. Para ello, inicialmente se recopilaron muestras de sangre de cada animal, que posteriormente serían analizadas mediante serología, concretamente mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), con el fin de detectar la posible presencia de anticuerpos.

En tercer lugar, se pretendía valorar la presencia de infección activa por los agentes estudiados, y para ello se usó la técnica molecular de la reacción en cadena de la polimerasa, o PCR, con el fin de detectar el ADN de estos agentes a partir de sangre completa obtenida de cada animal.

En cuarto lugar, se quería conocer la presencia de estos agentes en la sangre de cada animal y para ello, en aquellos casos en los que fue posible, se procedió a la obtención de sangre estéril para su posterior cultivo en líneas celulares específicas. Periódicamente se obtenían pequeñas alícuotas de dichos cultivos celulares, que eran analizadas mediante microscopía óptica y PCR con el fin de intentar detectar la presencia de estos agentes.

Por último, a partir de todos los datos recogidos de cada animal, se procedió al análisis estadístico de todos los resultados, con el fin de conocer la presencia de

asociaciones estadísticas entre la positividad a estos agentes y todas las variables analizadas.

4.2 ANIMALES

En este estudio fueron incluidos **680** gatos de distintas procedencias atendidos entre septiembre de 2005 y agosto de 2008.

En primer lugar, se incluyeron un total de 426 gatos que acudieron al **Hospital Clínico Veterinario Complutense** (HCVC) de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) en los que, por motivos médicos o quirúrgicos, fue necesaria la obtención de una muestra de sangre de los mismos.

Por otro lado, se incluyeron en el estudio 113 gatos procedentes de diferentes **clínicas** privadas, como son la Clínica Veterinaria Gattos (Madrid) y la Clínica Veterinaria Timanfaya (Madrid), acudiendo los animales a la consulta, del mismo modo, por razones médicas, quirúrgicas o para vacunaciones.

Además, para completar el estudio, se tomaron muestras de 141 gatos procedentes de la **calle** que eran recogidos por protectoras de animales o clínicas privadas, como son la Clínica Veterinaria ITECA (Alcobendas), que colabora con las protectoras Amnistía Animal y Asociación Nacional Amigos de los Animales (ANAA), la Clínica Veterinaria Puerta del Ángel, la Sociedad Protectora de Animales y Plantas (SPAP), el Centro Integral de Acogida de Animales de la Comunidad de Madrid (CIAAM) y la Asociación para la Liberación y Bienestar Animal (ALBA), en las cuales la mayoría de los gatos callejeros fueron sometidos a una castración, en cuyo momento se realizó la toma de muestras.

En todo momento se contó con el consentimiento de los responsables de todas estas clínicas y asociaciones de animales. Del mismo modo el estudio contó con el informe favorable del Comité de Experimentación Animal (CEA) de la Universidad Complutense de Madrid.

Los 680 gatos incluidos en el estudio fueron agrupados según su procedencia en gatos procedentes de **clínicas**, con un total de 539 gatos (79,3%) y gatos **callejeros**, con un total de 141 gatos (20,7%) (Tabla y Figura 1).

Tabla y Figura 1. Relación de animales según procedencia

Procedencia	n	Porcentaje
Callejero	141	20,7%
Clínica	539	79,3%
Total	680	100,0%



En algunos casos, especialmente en los gatos procedentes de la calle, los datos recogidos de cada animal fueron mínimos, por lo que en muchas variables la muestra no llega a ser de los 680 casos incluidos en el estudio. No obstante, se ha preferido incluir toda la información disponible, dada la escasez de estudios al respecto en estas poblaciones y con el fin de evaluar gatos de muy diferentes procedencias.

De la población analizada, un 75% eran gatos **Comunes Europeos** y un 25% de **otras razas**, estando este grupo representado por 12 razas diferentes, entre las que se incluyen: Abisinio, Angora Turco, Azul Ruso, Bombay, Bosque de Noruega, British, Cartujano Azul, Charplaninatz, Esfinge, Maine Coon, Persa y Siamés. La Tabla y Figura 2 y la Tabla 1 describen los porcentajes que representan cada raza.

Tabla y Figura 2. Relación de animales según la raza

Raza	n	Porcentaje
C. Europeo	463	75,0%
Otras razas	154	25,0%
Total	617	100%

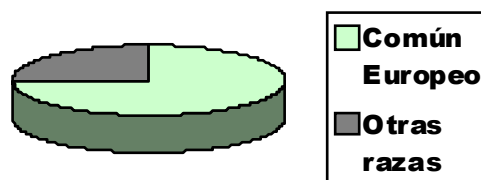


Tabla 1. Descripción de las razas de los gatos incluidos en el estudio

Descripción Raza	n	Porcentaje
Abisinio	1	0,2%
Angora Turco	3	0,5%
Azul Ruso	4	0,6%
Bombay	1	0,2%
Bosque Noruega	5	0,8%
British	3	0,5%
Cartujano Azul	1	0,2%
Charplaninatz	1	0,2%
Común E.	463	75%
Esfinge	1	0,2%
Maine Coon	3	0,5%
Persa	57	9,2%
Siamés	74	12%
Total	617	100%

Los animales se clasificaron en 3 grupos según su **edad**: cachorros (hasta 1 año de edad), adultos (entre 1 y 10 años) y geriátricos (más de 10 años). La edad media de los gatos del estudio fue de 5,8 años, estando el rango de edad comprendido entre 1 mes y 21 años. Un 19,5% de los animales eran cachorros, un 57,2% adultos y un 23,3% geriátricos. La distribución de la población de gatos en función de la edad queda reflejada en la Tabla 2.

Tabla 2. Relación de animales según la edad

Grupo de edad	n	Porcentaje
Cachorros	113	19,5%
Adultos	332	57,2%
Geriátricos	135	23,3%
Total	580	100%

En cuanto al **sexo** de los gatos, un 53,5% eran hembras y un 46,5% machos (Tabla 3).

Tabla 3. Relación de animales según el sexo

Sexo	n	Porcentaje
Machos	289	46,5%
Hembras	333	53,5%
Total	622	100%

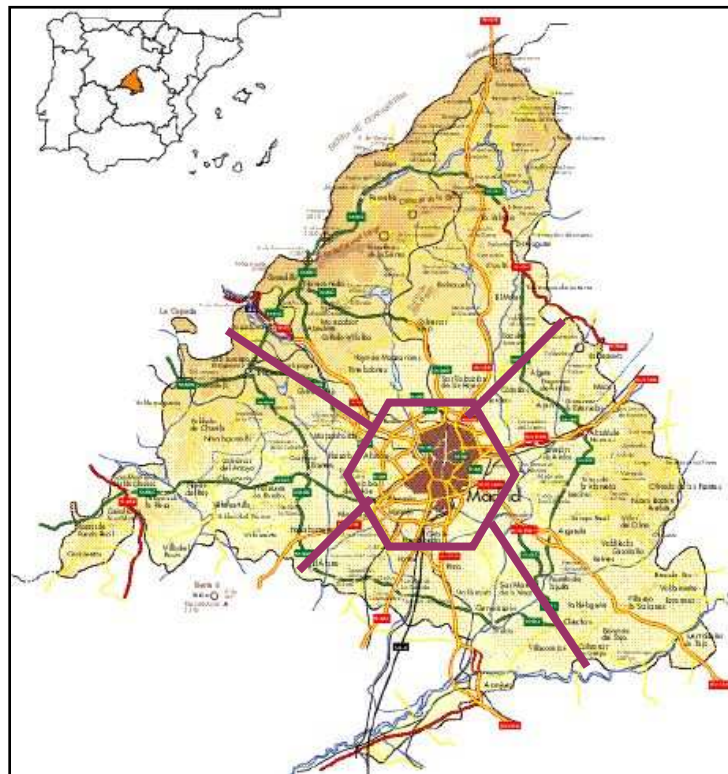
El 56,3% de los animales estaban **castrados**, frente al 43,7% que no lo estaba (Tabla 4).

Tabla 4. Relación de animales según si están castrados o no

¿Castrado?	N	Porcentaje
Sí	325	56,3%
No	252	43,7%
Total	577	100%

Los animales fueron divididos en varios grupos en función de su lugar de residencia. Así, en función del **área geográfica** de Madrid de la que procedían los animales, creamos 5 áreas: área Norte, área Oeste, área Sur, área Este y área Capital o Centro (Figura 1). Dichas zonas han sido adaptadas para este estudio basándonos en el mapa de zonificación sanitaria de la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid.

Figura 1. Mapa de la Comunidad de Madrid con las diferentes áreas geográficas seleccionadas



4.3 RECOGIDA DE DATOS DE CADA ANIMAL

Con el fin de facilitar la recogida de datos y para conseguir una homogeneidad en ellos, se confeccionó una ficha que se completó con los datos de cada gato. Para tal fin, se realizó la anamnesis y exploración del animal. Dicha ficha aparece detallada a continuación:

Nº Registro: Procedencia:	ENCUESTA	Fecha:
<u>PROPIETARIO:</u>		
-Nombre: -Dirección: -Teléfono:		
<u>ANIMAL:</u>		
-Nombre: -Raza: -Edad: -Sexo: -¿Castrado/a?:		
<u>EPIDEMIOLOGÍA:</u>		
-Lugar de residencia: -Hábitat urbano/rural/periurbano: -Tipo de vivienda: -Vive fuera/dentro casa: -Contacto con otros animales, ¿cuáles? : -Presencia de garrapatas/pulgas/ingest.roedores,pájaros, otros: -Transfusión de sangre: -Tratamiento antiparasitario externo: -¿Tratamiento con doxiciclina previo?: -Viajes (zona):		
<u>SINTOMATOLOGÍA:</u>		
-¿Enf. Concurrente? (FeLV, FIV, PIF): -Signos de enfermedad: * <i>Generales</i> : fiebre, pérdida peso, anorexia, deshidratación, depresión, letargia, hemorragias, mucosas pálidas, linfadenomegalia, esplenomegalia, hiperestesia... * <i>Digestivos</i> : vómitos, diarreas... * <i>Card-resp</i> : disnea, taquipnea... * <i>Oculares</i> : uveitis, conjuntivitis, secreción ocular, otros * <i>Locomotores</i> : poliartritis, polimiositis, cojeras... * <i>Renales</i> : polidipsia/poliuria * <i>Neurológicos</i> : ataques, ataxia, alt vestibular... * <i>Otros</i> :		

4.4 MUESTRAS

De cada uno de los gatos objeto de estudio se obtuvo **sangre** a partir de la vena yugular o, en su caso, de la cefálica o de la safena. La sangre fue recogida en tubos de 1 ml con heparina y de 0,5 ml con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Tras su recogida, se llevó a cabo un hemograma y un análisis bioquímico. La muestra sobrante (plasma tras la centrifugación de la muestra en heparina y sangre completa en EDTA) se congeló a -20°C para su posterior análisis serológico y molecular, respectivamente. En los casos en los que fue posible, se obtuvo sangre estéril a partir de vena yugular, que fue almacenada en tubos estériles de 5 ml con heparina (BD Vacutainer®) para el posterior cultivo de la misma en líneas celulares específicas.

4.5 ANALÍTICA SANGUÍNEA

Como acabamos de comentar, inicialmente se realizó un **hemograma** completo a partir de la sangre recogida en tubos con EDTA y un análisis **bioquímico** básico de la sangre en heparina. El hemograma se realizó en un contador celular (modelo Sysmex® Micro Cell Counter F-800, Toa Medical Electronics, Ltd, Kobe, Japan). Los parámetros hematológicos valorados incluían el hematocrito, hemoglobina, número de glóbulos rojos, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración media de hemoglobina corpuscular (CMHC), un recuento de leucocitos (incluyendo la fórmula leucocitaria, que se determinó por lectura microscópica del frotis teñido con May-Grünwald Giemsa) y el recuento de plaquetas. Se realizó un perfil bioquímico básico, valorándose el nivel de glucosa, urea, creatinina, proteínas totales y ALT. La medición de los valores de glucosa, urea, creatinina y ALT se llevó a cabo mediante técnicas de espectrofotometría de reflexión (Reflotron® Plus, Roche Diagnostics, Barcelona, España). Las proteínas totales fueron medidas mediante refractometría. Los valores de referencia del hemograma y el análisis bioquímico empleados en este estudio quedan reflejados en la Tabla 5.

Tabla 5. Valores de referencia del hemograma y del análisis bioquímico

Parámetros hemograma	Especie felina
Hematocrito (%)	24-45
Hemoglobina (g/dl)	11-15
G. rojos x 10 ⁶ /μl	5-10
VCM (fl)	39-55
HCM (pg)	12,5-17,5
CMHC (g/dl)	30-36
Plaquetas x 10 ³ /μl	300-700
Leucocitos x 10 ³ /μl	5,5-14
Neutrófilos seg/μl (%)	2500-12500 (35-75)
Neutrófilos cay/μl (%)	0-300 (0-3)
Linfocitos/μl (%)	1500-7000 (20-55)
Monocitos/μl (%)	0-850 (1-4)
Eosinófilos/μl (%)	0-1500 (2-12)
Parámetros bioquímicos	Especie felina
Glucosa	71-136
Urea	38-71
Creatinina	0,7-1,8
ALT	8,3-52,5
Proteínas Totales	6-7,5

En la **extensión de sangre** se valoró la posible existencia de cuerpos de inclusión en las células de la serie blanca o en plaquetas, así como la presencia de otros parásitos hemáticos.

Igualmente se llevó a cabo el test del virus de la leucemia y de la inmunodeficiencia felina (**FeLV/FIV**) empleando un kit comercial (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, Estados Unidos).

4.6 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO: INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

El plasma obtenido de la centrifugación de las muestras de heparina recogidas de cada animal fue sometido a un análisis serológico mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en nuestro laboratorio (Servicio de Diagnóstico de Ehrlichiosis y Leishmaniosis Canina de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid). Dicha técnica tiene como fin la detección de anticuerpos en el animal frente a uno o varios de los agentes objeto de estudio, como son *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Neorickettsia risticii*, *Leishmania infantum* y *Bartonella henselae*. Para ello, se enfrenta el plasma del animal, que posee o no los anticuerpos concretos, a un antígeno específico. Si existen anticuerpos específicos en el animal, éstos podrán verse tras añadir un suero antiinmunoglobulina que va unido a un compuesto fluorescente (Coligan, 1992).

4.6.1 Antígenos empleados

Según el agente objeto de detección se emplearon antígenos diferentes. Así, para la detección de anticuerpos frente a *E. canis*, se empleó como antígeno el sobrenadante de la línea celular canina DH82 (ATCC® number: CRL-10389) infectada por *E. canis* Madrid, propiedad de nuestro grupo de trabajo (Número de Acceso en GenBank: AY394465). El porcentaje de células infectadas en el cultivo era de un mínimo de un 50%.

Para *A. phagocytophilum* se empleó un antígeno comercial de Protatek International, Inc., Minneapolis, Estados Unidos (Cat N°: AG-112).

Para *N. risticii*, se empleó sobrenadante de cultivo de la línea celular P388D1 infectada por *N. risticii*, cedido por el Dr. I. Kakoma de la Universidad de Illinois, Estados Unidos.

En el caso de *L. infantum*, el antígeno procedía de un cultivo de promastigotes de *L. infantum* L-75 en medio NNN.

Por último, el antígeno de *B. henselae* procedía del sobrenadante del cultivo de la línea celular Vero (ATCC® number: CCL-81) infectada por el agente *B. henselae* Houston-1 (ATCC® number: 49882).

En el caso de *A. phagocytophilum*, el antígeno comercial venía ya fijado en portas esmerilados especiales para inmunofluorescencia. En el resto de las especies, el antígeno se obtuvo a partir de sobrenadantes de los cultivos. Dichos cultivos se diluyeron y resuspendieron en PBS y se centrifugaron a 150 xg durante 10 minutos a 22°C. El precipitado se resuspendió nuevamente en PBS para un nuevo lavado similar, tras el cual se procedió a su dilución final en PBS. Tras comprobar la densidad de células en el microscopio, se colocaron 20 µl de antígeno en cada pocillo de los portas esmerilados especiales de inmunofluorescencia de 18 pocillos de 4 mm de diámetro (Cel-line®, Cultek S. L. U., Madrid, España) y se dejaron secar al aire. Posteriormente, se almacenaron en congelación a -20°C hasta su empleo. En el momento de su uso, era necesario descongelar los portas a temperatura ambiente durante 30-45 minutos.

4.6.2 Técnica

La técnica de IFI empleada para la detección de anticuerpos frente a los distintos agentes estudiados fue similar. Dicho protocolo de IFI realizado en nuestro laboratorio comprende los siguientes pasos:

- En un primer lugar se realizaban las **diluciones** seriadas de los sueros en PBS (phosphate buffer solution) a pH: 7,2, empleando microplacas para ello. Para *E. canis*, *A. phagocytophilum* y *N. risticii* las diluciones empleadas inicialmente fueron 1:40, 1:80,

1:160 y 1:320. Para *L. infantum*, las diluciones fueron 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400. Para *B. henselae* se emplearon las diluciones 1:16, 1:32 y 1:64. Además, en cada porta se incluyó un suero control negativo y otro positivo. Los controles positivos de *E. canis* y *L. infantum* procedían de la seroteca del Servicio de Diagnóstico de Ehrlichiosis y Leishmaniosis Canina de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. Los controles positivos de *A. phagocytophilum* y *N. risticii* procedían de Protatek International, Inc. (Minneapolis, Estados Unidos). En el caso de *B. henselae*, el control positivo era comercial (MegaCor Diagnostik mbH, Austria).

- Posteriormente se depositaban las diluciones de las muestras problema en los pocillos de los **portas** de IFI previamente descongelados (Imagen 1A), incluidos los controles positivo y negativo.

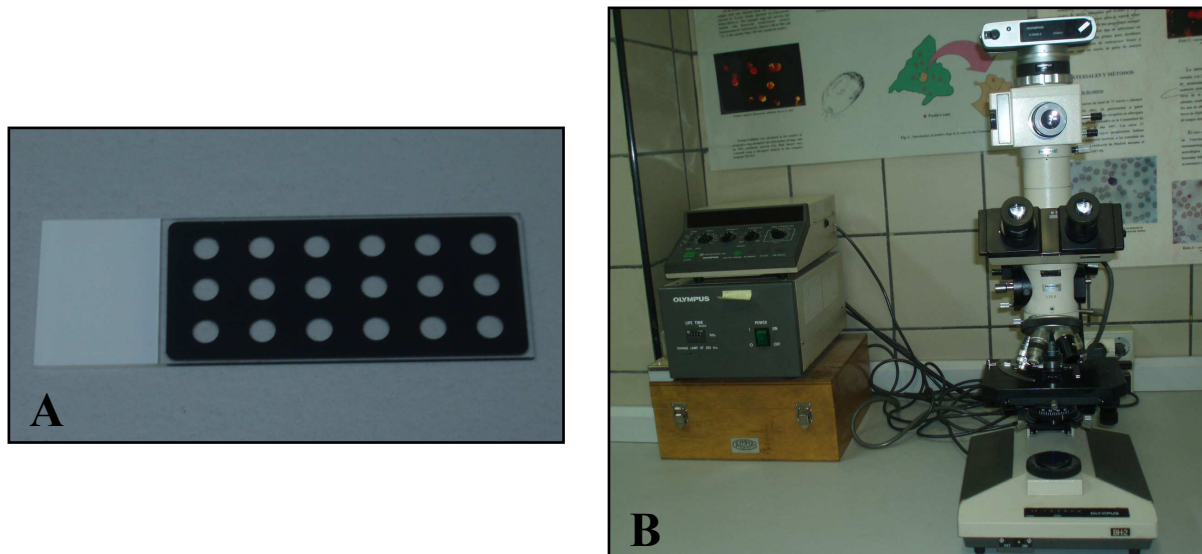
- Se incubaban los portas en la estufa a 37°C durante 30 minutos y posteriormente se realizaban tres **lavados** de cinco minutos en agitación en PBS a pH de 7,2.

- Se incubaban los portas a temperatura ambiente y se añadía en cada pocillo 20 µl de un anticuerpo secundario anti-IgG de perro obtenido en conejo, conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Suffolk, Reino Unido) a una dilución 1:100 en PBS a pH de 7,2 y empleando **azul de Evans** como contraste (a una concentración final de 1:1000).

- Se dejaba incubar durante otros 30 minutos con el conjugado, retirándose el resto de conjugado de los pocillos y realizando otra serie de tres **lavados** en PBS.

- Tras este último paso, se dejaban secar los portas a temperatura ambiente en la oscuridad y se montaban para su lectura con **glicerina tamponada** comercial (Fluoprep®, Biomérieux, Madrid, España) y, sobre ella, un cubreobjetos.

Imagen 1. A: Portas especiales para inmunofluorescencia indirecta. B: Microscopio de epifluorescencia



La **lectura** de los portas se realizaba empleando un microscopio de epifluorescencia Olympus BH-2® (Olympus Imaging America Inc., Center Valley, Pennsylvania, Estados Unidos) (Imagen 1B) con filtro azul, empleando el objetivo de 40X aumentos. Se comenzaba observando los pocillos con controles para comprobar su positividad o negatividad, tras lo cual se leían las muestras problema. El título de anticuerpos se establecía en la máxima dilución del suero a la que se detectaba una fluorescencia fuerte.

4.6.3 Puntos de corte

El punto de corte para considerar a un animal seropositivo a *E. canis*, *A. phagocytophilum* y *N. risticii* se estableció en **1:40**. Para *L. infantum*, el punto de corte se estableció en **1:50**. Para *B. henselae*, dicho punto de corte se fijó en **1:64**.

4.7 CULTIVOS CELULARES

En los casos en que fue posible, se realizó la extracción de sangre de forma estéril a partir de vena yugular procediendo a la esterilización previa de la zona con alcohol de 96° y Betadine®, y empleando material estéril. La muestra de sangre recogida se introdujo directamente en tubos vacutainer estériles con heparina (BD Vacutainer®) sobre los que también se aplicaba previamente alcohol de 96°. La muestra se centrifugó durante unos 5-10 minutos a 447 xg. Posteriormente, y siempre dentro de las tres primeras horas posteriores a la extracción, se procedía al cultivo de dicha muestra de sangre en cultivos celulares de la capa de “*buffy coat*” o costra flogística.

Las **líneas celulares** empleadas para tal fin fueron las siguientes:

- Para el intento de cultivo de *E. canis* se empleó la línea celular canina denominada DH82 (ATCC® number: CRL-10389) que es de tipo macrofágica y crece en forma de tapiz, con las células pegadas al suelo del frasco de cultivo.
- Para el intento de cultivo de *A. phagocytophilum* se empleó la línea celular humana HL60 (ATCC® Number: CCL-240), que es una línea en suspensión en el medio, sin necesitar ningún soporte sobre el que crecer.
- Para el intento de cultivo de *N. risticii* se empleó la línea celular procedente de ratón P388D1 (ATCC® number: CCL- 46) y es también una línea que crece en suspensión en el medio.

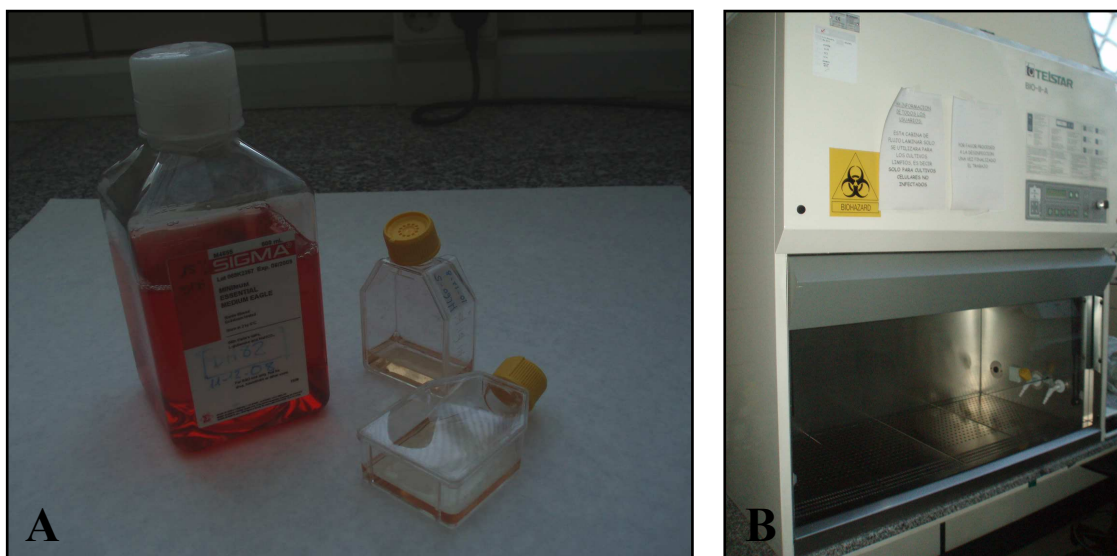
No se procedió al intento de cultivo de *Bartonella* spp. debido a que su aislamiento requiere mucho tiempo, son de muy difícil crecimiento y raramente se obtienen resultados satisfactorios cuando se trata de animales inmunocompetentes y no reservorios, probablemente debido al escaso número de bacterias circulantes en sangre (Rolain, 2001; Gouriet, 2005). Breitschwerdt y colaboradores han conseguido el crecimiento de estas bacterias con mayor facilidad empleando medios líquidos enriquecidos, como el medio

BAPGM (Maggi, 2005a), si bien este medio no está aún disponible de modo comercial. Igualmente, el cultivo de *Leishmania* spp. a partir de muestras de sangre es muy difícil e inusual. No obstante, *Leishmania* spp. puede crecer en la línea celular DH82 (Sainz, datos sin publicar).

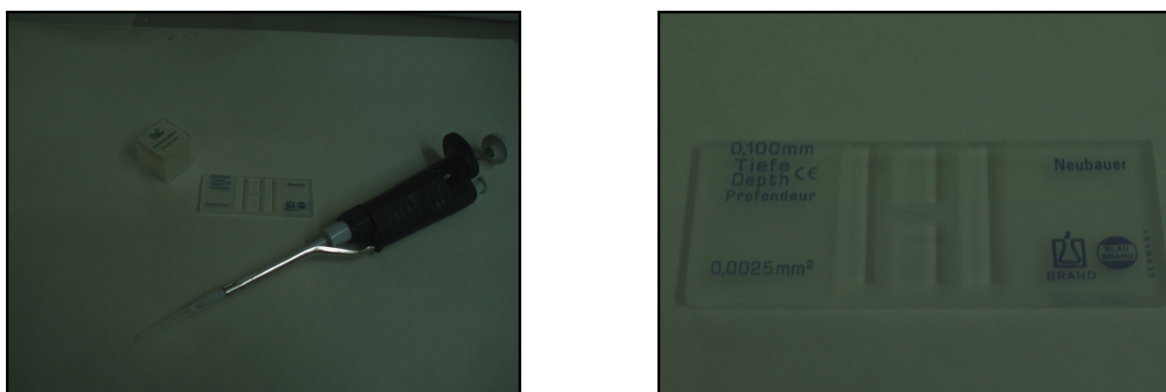
Además, fue necesario emplear una línea celular para la obtención de antígeno de *B. henselae* para la técnica de IFI, y para ello se hizo crecer la línea celular Vero procedente de riñón (ATCC® number: CCL-81) que posteriormente fue infectada con *B. henselae* Houston-1 (ATCC® number: 49882).

La cepa de *E. canis* Madrid (Accession Number en GenBank: AY394465) obtenida en nuestro laboratorio a partir de sangre de un perro con ehrlichiosis de nuestro entorno, era mantenida y reproducida en cultivos celulares en la línea DH82 del mismo modo que los demás cultivos, con el fin de obtener antígeno para las técnicas serológicas.

Las líneas celulares requirieron una serie de condiciones para su **mantenimiento**. Todos los cultivos se mantenían en frascos de tipo *falcon* de 25 cm² en condiciones estériles, sin el empleo de antibióticos, realizándose todas las labores de mantenimiento en una cabina de flujo laminar de bioseguridad tipo II-A (Telstar, España) (Imagen 2A). Los frascos se mantenían en estufa a una temperatura de 37°C con un 5% de CO₂ y humedad constante. Todos los cultivos celulares se sometían a un cambio de medio de cultivo tres veces por semana en cabina de flujo laminar (Imagen 2B), siguiendo las recomendaciones para cada línea celular. Las líneas celulares DH82 y Vero, libres o infectadas con los agentes *E. canis* y *B. henselae*, respectivamente, se mantuvieron empleando el medio de cultivo Minimum Essential Medium Eagle (MEM) (Sigma®, España), suplementado con un 15% de suero fetal bovino (Sigma®, España), en el caso de la línea DH82 y un 10% para la línea Vero. Las líneas celulares HL60 y P388D1 se mantuvieron utilizando medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma®, España) suplementado, respectivamente, con un 10 y 15% de suero fetal bovino (Sigma®, España).

Imagen 2. A: Frascos de cultivos celulares y medio de cultivo. B: Cabina de flujo laminar

Las células que crecen en suspensión, es decir, las de las líneas HL60 y P388D1, se sometían a recuentos periódicos, dado que la densidad celular debía estar dentro de unos límites. Para ello, eran teñidas con tripán azul preparado en solución con PBS a una concentración de 0,4%. El tripán azul se fija en las membranas de las células muertas, dándoles un color azulado. Posteriormente se procedía al recuento en cámara de Neubauer (Imagen 3). La densidad celular (sin contar las células muertas) se mantenía entre 2 y 3×10^5 células por mililitro para la línea celular HL60, sin exceder las 1×10^6 células por mililitro y entre 2 y 5×10^5 células/ml para la línea celular P388D1, sin exceder las 6×10^6 células/ml.

Imagen 3. Cámara de Neubauer para el recuento celular

Periódicamente, se procedió al **subcultivo** de cada línea celular, manteniéndose algunos de los frascos para su posterior infección y congelándose periódicamente otros de ellos. La **congelación** se llevó a cabo en todos los casos de manera similar, variando sólo en la recogida de las células. En las líneas celulares de crecimiento en forma de tapiz (DH82 y Vero), se emplearon 2-4 ml de tripsina (0,25% tripsina-EDTA solution, Sigma®, España) para el desprendimiento del tapiz a temperatura ambiente, se neutralizó la acción de la tripsina con 2-4 ml de medio de cultivo MEM y se recogió la mezcla en tubos estériles de fondo cónico. Dichos tubos se centrifugaron 10 minutos a 150 xg. Posteriormente se recogió el material sedimentado compuesto por las células, al que se le añadió medio fresco y Dimetilsulfóxido (DMSO) (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) a una concentración final del 5%, depositándose todo ello en tubos especiales de congelación. En las líneas celulares de crecimiento en suspensión, el proceso era similar, variando sólo que la recogida de las células era directamente con pipeta, sin necesidad de emplear tripsina. Los tubos eran posteriormente introducidos en un congelador a -20°C y, tras 2-3 horas, transferidos a otro congelador a -80°C o a un tanque de nitrógeno líquido, donde eran almacenados hasta su próximo uso en caso necesario. La **descongelación** de estos tubos donde se encuentran las líneas celulares se realizaba de forma directa mediante la introducción del tubo de congelación en un vaso de precipitados con agua destilada a 37°C, posteriormente se recogía la muestra con pipeta y se mezclaba con medio de cultivo fresco. Tras un período de 24 horas, para eliminar el DMSO restante en el medio de cultivo, se procedía a un cambio de dicho medio por medio fresco.

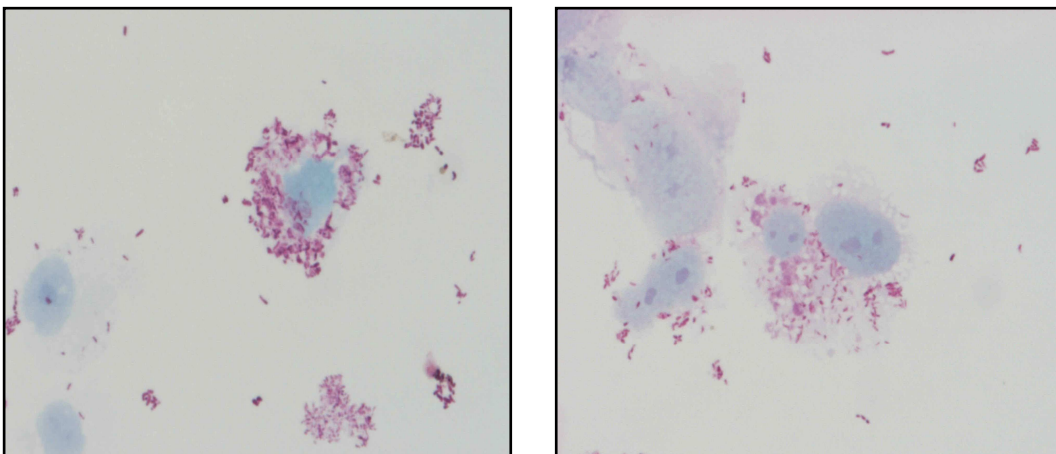
La **sangre de los gatos** obtenida en condiciones estériles era centrifugada durante 5-10 minutos a 447 xg y, siempre en condiciones estériles, se recogían con pipeta un mínimo de 0,2-0,4 ml de la capa de células blancas del tubo y se cultivaban en los frascos con las líneas celulares DH82, HL60 y P388D1. Estos cultivos se mantenían un mínimo de 2 meses para observar si existía crecimiento de algún agente objeto de nuestro estudio. En aquellos casos dudosos, los cultivos se mantenían incluso hasta 5 meses. En todos los casos se procedió a la congelación posterior de los cultivos.

La **detección de infección** celular de nuestras líneas celulares fue determinada mediante la tinción periódica de los cultivos y mediante el empleo de técnicas moleculares para la detección directa de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. y *Neorickettsia* spp., que

explicaremos en otro apartado. Así, semanalmente, se procedió a la recogida de sobrenadante de cada línea celular, infectada o no, procediéndose a su **tinción** mediante el método May-Grünwald-Giemsa para observar el crecimiento y posibles cambios en las células, así como el porcentaje de infección en su caso. Para ello, se recogían 100 µl de sobrenadante y se procedía a su centrifugación en una citocentrífuga (Cytospin® 3, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) para la fijación de las células en un portaobjetos. Posteriormente se realizaba la tinción, se dejaba secar a temperatura ambiente, se fijaba con DPX Mountant (Surgipath Europe LTD, Richmond, Illinois, Estados Unidos) y finalmente se observaba la preparación empleando el microscopio óptico a distintos aumentos (10X, 40X e inmersión a 100X). En aquellas líneas celulares infectadas, el porcentaje de infección celular se determinó mediante el recuento al microscopio de un mínimo de 100 células. Además, dicha infección fue analizada igualmente mediante técnicas moleculares.

Las líneas celulares infectadas que empleamos como antígenos para la técnica de IFI se mantenían y controlaban periódicamente del mismo modo que acabamos de expresar. Además, para la visualización de *Bartonella* spp. en el cultivo empleado como fuente de antígeno, se empleó la tinción de Giménez (Materlab, S.L., Madrid, España) en lugar de May-Grünwald-Giemsa (Imagen 4).

Imagen 4. Imágenes de tinción de *Bartonella* spp. mediante la tinción Giménez. Destacan las bartonellas de color rosa fuerte frente al color verde-azulado de las células Vero que parasitan



4.8 DIAGNÓSTICO MOLECULAR: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La técnica de PCR tiene como objetivo la amplificación selectiva de un segmento de ADN a partir de dos oligonucleótidos sintéticos, llamados cebadores, de unos 18-25 pb, que son complementarios a las zonas extremas de la región que se quiere amplificar. En nuestro caso, estamos interesados en la detección de ADN de *E. canis*, *A. phagocytophilum*, *N. risticii*, *B. henselae* y *L. infantum*.

El proceso de amplificación del ADN comprende 3 fases: desnaturalización, hibridación de los cebadores y extensión. La desnaturalización lleva consigo la separación de la doble hebra de ADN en dos hebras simples, y se realiza mediante calor. Se produce la unión de los cebadores a su región complementaria específica del ADN y la enzima ADN-polimerasa empieza a incorporar desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's) para la síntesis de nuevas hebras de ADN. Esto se repite durante una serie de ciclos, y se obtiene un elevado número de copias de ADN que se pueden visualizar posteriormente empleando geles de electroforesis.

4.8.1 Instalaciones

Con el fin de disminuir en lo posible la probabilidad de contaminación con ADN, se tomaron **medidas preventivas** en cada una de las fases del procesado de muestras, que incluyen la extracción de ADN y preparación de la PCR (actividades pre-PCR), ejecución de la PCR, visualización en gel de electroforesis y purificación del ADN amplificado (post-PCR). Nos hemos ajustado en la medida de lo posible a las recomendaciones de algunos autores (Kwok, 1989, Newton, 1995).

Una de las medidas que se tomó fue la separación física en la ejecución de cada fase. La extracción de ADN, la ejecución de la PCR, la lectura en gel de electroforesis y la purificación del ADN amplificado se realizó en áreas diferentes. La preparación de la

mezcla de PCR se realizó en otra sala diferente, y en cabina de flujo laminar. La manipulación de los reactivos se realizó igualmente en la cabina de flujo laminar.

Otra medida tomada para disminuir la probabilidad de contaminación es la realización de alícuotas de todos los reactivos, así como la centrifugación de cada tubo con los reactivos previo a la apertura del mismo.

Además, las muestras de ADN y los reactivos estaban separados físicamente en distintas áreas de almacenamiento.

La preparación de la PCR se realizó en forma de *mix* o premezcla, de forma que todos los reactivos fueron mezclados en esta premezcla que posteriormente se dividía en cada uno de los tubos independientes para luego añadir el ADN de las muestras que se querían incluir, ganando tiempo y evitando el pipeteo excesivo que supondría la preparación de un *mix* de cada una de las muestras a analizar. En la preparación de la mezcla, el pipeteo del ADN siempre era el último paso, y se empleaban pipetas y puntas específicas para tal fin. Cada 7-8 muestras incluidas se incluía un control negativo como control de la reacción.

Se emplearon guantes de protección en todo momento, que además eran sustituidos regularmente y al cambiar de cada actividad, así como ropa de laboratorio específica y diferente según la actividad.

Las pipetas empleadas eran también diferentes según la actividad (extracción, preparación de la mezcla de PCR, lectura en gel y purificación) y eran autoclavadas con regularidad; además, las puntas empleadas poseían filtro para el ADN.

El agua estéril para inyectable empleada para la reacción de PCR era alícuotada y autoclavada regularmente. Todos los utensilios plásticos empleados eran igualmente esterilizados. Las gradillas empleadas para preparar la mezcla de PCR y como sustrato donde se colocaban las muestras ya amplificadas, eran sumergidas diariamente tras cada actividad en lejía al 10% durante un mínimo de 30 minutos. Se empleó también la luz ultravioleta en la cabina de flujo laminar.

Como norma general de trabajo se realizaba la preparación y lectura de los geles, así como la purificación, de forma posterior a las otras fases, por el elevado riesgo que conlleva la manipulación de muestras de ADN ya amplificado (millones de copias por microlitro) y del material que está en contacto con él.

4.8.2 Extracción de ADN

A partir de 200 µl de la sangre recogida en EDTA se procedió a la extracción de ADN empleando el kit de extracción “UltraClean™ DNA BloodSpin Kit” (Mo Bio Laboratories, Inc., Carlsbad, California, Estados Unidos), siguiendo el protocolo del fabricante. El volumen final de ADN extraído era de 200 µl.

Para la obtención de controles positivos para la técnica, se realizó la extracción de ADN a partir de sobrenadante de los cultivos de *E.canis* en DH82 y *B. henselae* en Vero, a partir del cultivo de promastigotes de *L. infantum* en NNN, y a partir del antígeno fijado en portas de *A. phagocytophilum* y *N. risticii*.

Como control negativo de la técnica se empleó agua estéril para inyectable (B. Braun Medical, S. A., Barcelona, España).

4.8.3 Control de la extracción

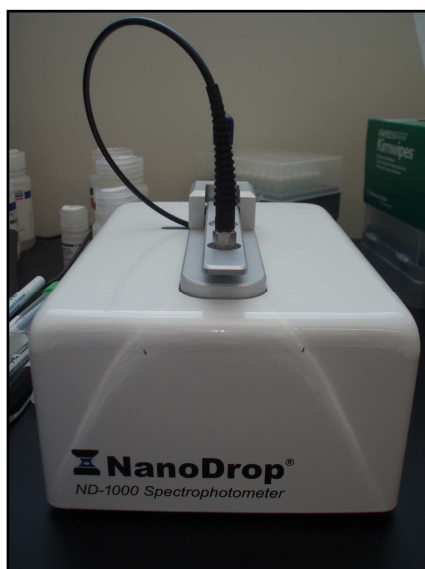
Los genes de mantenimiento celular o *housekeeping* codifican para proteínas que son esenciales para la fisiología y funcionamiento celular (en cierto sentido actúan como *housekeepers* para la célula). Estos genes se expresan en la mayoría de las células. El gen de mantenimiento celular más común es el gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa o **GAPDH**, que codifica para una enzima que es esencial en la glicolisis. La expresión del gen GAPDH se ha empleado como un marcador de expresión, siendo considerado un gen de mantenimiento celular invariable. La ausencia de inhibidores de la PCR se demostró así mediante la amplificación de este gen GAPDH. Para ello se realizó una PCR con los cebadores que amplifican este gen GAPDH como control de la reacción de extracción

(Birkenheuer, 2003, Barber, 2005). Las condiciones exactas de la reacción se detallan en el apartado de procesamiento de las muestras mediante PCR.

4.8.4 Cuantificación de ADN y calidad del mismo

Todas las muestras de ADN, una vez realizada la extracción, fueron cuantificadas en la Unidad de Genómica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid. La concentración de ADN fue medida mediante espectrofotometría empleando la tecnología NanoDrop™ (Thermo Scientific, Delaware, Estados Unidos) (Imagen 5), midiéndose la absorbancia de la luz ultravioleta a dos longitudes de onda: 260nm y 280 nm. La lectura a 260 nm nos indica la concentración de ADN de la muestra. La concentración idónea de ADN por muestra es de 10-40 ng/μl. Todas aquellas muestras que se encontraban por encima o por debajo del rango eran sometidas a un ajuste a la hora de realizar el protocolo de PCR.

Imagen 5. Nanodrop™, empleado para medir la concentración de ADN de las muestras



También se realizó la lectura de la densidad óptica a 280 nm, que es donde se absorben las proteínas. La relación entre las dos longitudes de onda (260nm y 280 nm) o bien ADN/proteínas, permite estimar la pureza del ADN y comprobar la posible

contaminación de la muestra con proteínas. Una relación 260/280 de entre 1,6 y 2 nm indica que el ácido nucleico es óptimo para su utilización.

4.8.5 Procesado de las muestras mediante PCR

Cada una de las muestras fue analizada mediante PCR para la detección de ADN de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Neorickettsia* spp., *Bartonella* spp. y *Leishmania* spp. Para el caso de ***Ehrlichia* spp.**, ***Anaplasma* spp.** y ***Neorickettsia* spp.** se realizó una única PCR convencional y se emplearon unos cebadores capaces de amplificar todas estas especies a nivel de género. En los casos en los que se obtuvo una amplificación, se realizó una PCR a nivel de especie, con el fin de detectar ADN de *E. canis*, *A. phagocytophilum*, *A. platys* o *N. risticii*, empleando unos cebadores más específicos. Para el caso de *A. phagocytophilum* se empleó una PCR en tiempo real, para la amplificación a nivel de especie. En el caso de ***Bartonella* spp.**, también se efectuó una PCR convencional, empleándose cebadores que amplifican este agente a nivel de género. Cuando se obtuvo una amplificación en esta PCR, se purificó el ADN y se procedió a su secuenciación, para determinar la especie de la que se trataba. En algún caso, para este agente, se realizó la clonación en plásmido previo a su envío a secuenciación. Para la amplificación de ADN de ***Leishmania* spp.** se empleó igualmente una PCR convencional, pero en este caso empleándose unos cebadores que amplifican una porción del ADN del kinetoplasto de *L. infantum* (Lachaud, 2002). En los casos en los que se obtuvo amplificación, se procedió igualmente a la purificación del ADN obtenido y su posterior secuenciación.

En el caso del gen GAPDH, se realizó una PCR convencional con los cebadores específicos, esperándose la obtención de amplificación en todos los casos, lo que indicaría que existe ADN amplificable y sin inhibidores de la reacción de PCR.

Para todos los casos, excepto para la amplificación a nivel de especie de *A. phagocytophilum*, se emplearon los termocicladores MasterCycler® Personal y/o el MasterCycler® ep Gradient (Eppendorf, Alemania) (Imagen 6). Para la amplificación de ADN de *A. phagocytophilum* se empleó el termociclador SmartCycler TD System II (Cepheid, Sunnyvale, California, Estados Unidos) (Imagen 7).

Imagen 6. A: MasterCycler® Personal. B: MasterCycler® ep Gradient

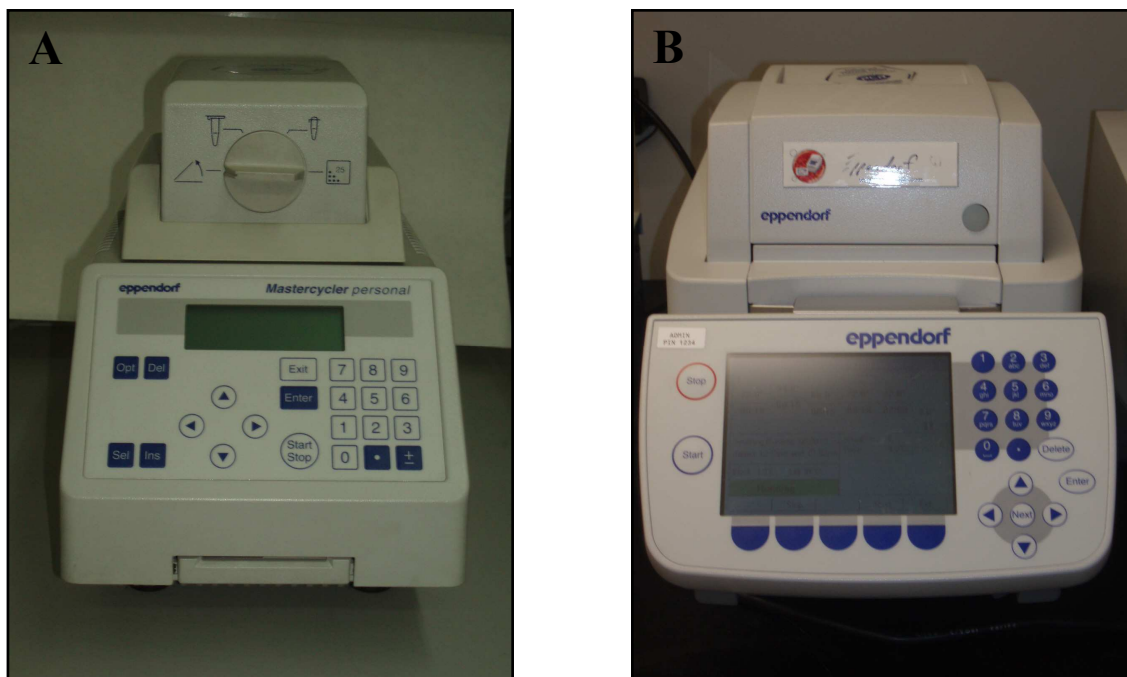
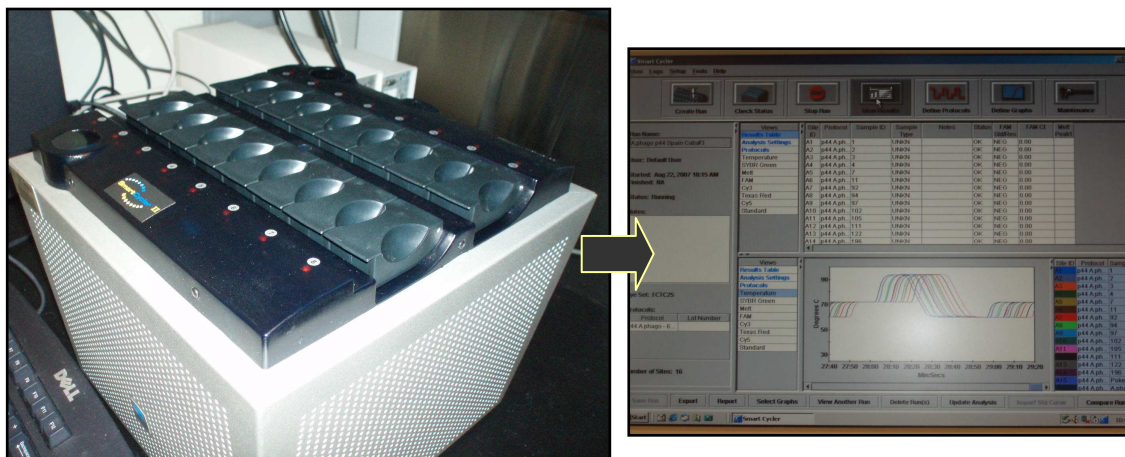


Imagen 7. SmartCycler TD System II y la recogida de datos en el ordenador



Los protocolos de PCR empleados eran comunes para algunos de los agentes objeto de estudio, pero diferentes para otros. En algunos de los protocolos empleados no fue necesaria la puesta a punto de la técnica, también conocida como optimización de la reacción, puesto que se trata de protocolos de PCR ya estipulados y empleados rutinariamente en el “Intracellular Pathogen Research Laboratory, Dep. Clinical Sciences,

Raleigh, North Carolina, Estados Unidos”. No obstante, antes de comenzar el procesamiento de las muestras de este estudio, se confirmó la reproducibilidad de dichos protocolos en nuestro laboratorio. Para el caso de *Leishmania* spp., fue necesaria la optimización de la técnica a partir de estudios publicados por Lachaud y colaboradores (Lachaud, 2002) y Fichoux y colaboradores (Fichoux, 1999).

A continuación describiremos el protocolo empleado en la detección del gen GAPDH y en cada uno de los agentes objeto de estudio, así como los cambios realizados en la técnica de PCR de *Leishmania* spp.:

- **Cebadores para el gen GAPDH**

Para el control de la extracción o *housekeeping* se emplearon los cebadores **GAPDH-1** (5'-CCTTCATTGACCTCAACTACAT) y **GAPDH-2** (5'-CCAAAGTTGTCATGGATGACC) (Birkenheuer, 2003, Barber, 2005).

- **Cebadores para la amplificación de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp y *Neorickettsia* spp.**

Los cebadores empleados para cada agente eran diferentes, si bien la técnica y el ciclo empleado coincidían. Así, para la amplificación de ADN de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. y *Neorickettsia* spp. se emplearon los cebadores **GEP-s** (5'-CTGGCGGCAAGCYTAACACATGCAAGTCGAACGGA) y **GEP-as** (5'-CTTCTRTRGGTACCGTCATTATCTTCCCYAYTG) (Eddlestone, 2007), que tienen como diana la porción 16S del ARN ribosómico.

En algunos casos en que se obtuvieron amplificaciones dudosas, se realizó otra PCR con cebadores que tienen como diana el operón de choque térmico (groESL) que son el **groEL-643s** (5'-ACTGATGGTATGCARTTTGAYCG) y **groEL-1236as** (5'-TCTTTRCGTTCYTTMACYTCAACTTC) (Primers diseñados por el equipo de diagnóstico del “Intracellular Pathogen Research Laboratory, Dep. Clinical Sciences, Raleigh, North Carolina, Estados Unidos”)

- **Cebadores para la amplificación de *Bartonella* spp.**

Para la amplificación de *Bartonella* spp. se emplearon los cebadores **ITS 325-s** (5'-CTTCAGATGATGATCCCAAGCCTTTTGGCG) e **ITS 1100-as** (5'-GAACCGACGACCCCCTGCTTCGAAAGCA) (Diniz, 2007) que amplifican una parte de ADN del espacio intergénico entre las porciones 16S-23S del gen ARNr (ITS).

También se amplificaron muestras dudosas mediante otra PCR, utilizando el gen *RpoB* como gen diana, empleándose como cebadores el **RpoB-1615s** (5'-ATYACYCATAARCGYCGTCTTTCTGCTCTTGG) y el **RpoB-2267as** (5'-GGATCTAAATCTTCYGTGACGRATAACAATACG). (Diniz, 2007).

- **Cebadores para la amplificación de *Leishmania* spp.**

En este caso los cebadores empleados amplifican ADN del kinetoplasto del parásito y son los cebadores **LSH-1** (5'-CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG) y **LSH-2** (5'-CCACCTGGCCTATTTTACACCA), que corresponden a los denominados por otros autores como RV1 y RV2 (Lachaud, 2002).

- **Cebadores específicos de especie**

En algunos casos en los que se obtuvo amplificación en la PCR a nivel de género, se emplearon cebadores más específicos para determinar con qué especie se correspondía dicha amplificación obtenida. Así, cuando se obtuvo amplificación empleando la PCR de *Ehrlichia/Anaplasma/Neorickettsia* spp. a nivel de género, se realizó una PCR específica para *E. canis*, otra para *A. phagocytophilum*, otra para *A. platys* y otra para *N. risticii*.

La PCR de *E. canis* empleaba los cebadores ***E.canis*-s** (5'-CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA) y **SEP-as** (5'-CTTCTRTRGGTACCGTCATTATCTTCCCY), que tienen como diana la porción 16S del ARN ribosómico (Beall, 2008) y los cebadores **gro*E. canis*163-s** y **gro*E. canis* 573-as**, que amplifican una porción del operón de choque térmico (groESL) (Primers diseñados por

el equipo de diagnóstico del “Intracellular Pathogen Research Laboratory, Dep. Clinical Sciences, Raleigh, North Carolina, Estados Unidos”).

Para amplificar *A. phagocytophilum*, se emplearon los cebadores **3708F** (5'-GCTAAGGAGTTAGCTTATGAT) y **4257R** (5'-AAGAAGATCATAACAAGCATT), que tienen como gen diana el gen p44 (Primers diseñados por el equipo de diagnóstico del “Intracellular Pathogen Research Laboratory, Dep. Clinical Sciences, Raleigh, North Carolina, Estados Unidos”). En este caso se efectuó una PCR en tiempo real, como hemos comentado.

En la PCR de *A. platys* se emplearon los cebadores **groA.platys-35s** y **groA.platys-551as**, que tienen como diana una porción del operón de choque térmico (groESL) (Beall, 2008).

Para *N. risticii* se emplearon los cebadores **ER 5-3** (5'-ATTTGAGAGTTTGATCCTGG) y **ER 3-2** (5'-GTTTTAAATGCAGTTCTTGG) que tienen como diana la porción 16S del gen rRNA (Chaichanasiriwithaya, 1994).

4.8.6 Premezcla de reactivos

Para el caso del *housekeeping*, se emplearon como premezcla 4 µl de agua, 7,5 µl de Premix Taq®, 0,3 µl de cada cebador y 3 µl de ADN, obteniéndose un volumen final de 15 µl. Los cebadores se preparaban a una concentración de 30 µM, siendo la concentración en la solución final 0,6 µM.

La premezcla de reactivos empleados para la amplificación de *Ehrlichia spp.*, *Anaplasma spp.*, *Neorickettsia spp.*, y *Bartonella spp.* fue la misma, para todos los genes amplificados. Para dicha premezcla se empleó la solución Premix Taq® (Takara Ex Taq™ Version) que está compuesta por la enzima Takara a 1,25 U/25 µl, una mezcla de dNTPs a concentración 2X (0,4mM) y buffer de reacción concentrado a 2X, que incluye 4mM de Magnesio. Las cantidades empleadas en el premix fueron de 7,5 µl de agua, 12,5 µl de la Premix Taq®, 0,25 µl de cada cebador y 5 µl de ADN, obteniéndose un volumen final de

25 µl. Los cebadores de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. y *Neorickettsia* spp. se preparaban para su empleo a una concentración de 50 µM, a partir de los cebadores preparados a 100 µM según las recomendaciones del fabricante, con lo que la concentración final de cada cebador en la solución final era de 0,5 µM. Los cebadores de *Bartonella* spp. se preparaban a una concentración de 30 µM, que en la solución final correspondía con una concentración de 0,3 µM.

Para la amplificación de las especies *E. canis*, *A. phagocytophilum*, *A. platys* y *N. risticii* se emplearon 7 µl de agua, 12,5 µl de Premix Taq®, 0,25 µl de cada cebador (concentración en la solución final: 0,5 µM) y 5 µl de ADN, salvo para la amplificación de la porción 16S del rRNA de *E. canis*, en la que se emplearon 0,50 µl de cebadores (concentración en la solución final: 1 µM).

En el caso de *Leishmania* spp., a partir de los protocolos empleados por Lachaud y colaboradores, y Fichoux y colaboradores (Lachaud, 2002, Fichoux, 1999), se realizaron cambios en distintas variables, como son la concentración de cebadores a emplear, la cantidad de Taq a incluir en el Mastermix, la concentración de los dNTP's y la temperatura de anillamiento. Tras distintas pruebas, se estipuló que la reacción era más específica empleando las siguientes cantidades de reactivos: 31,8 µl de agua, 5 µl de buffers de reacción, 1 µl de dNTP's a concentración de 200 µM, 0,5 µl de cada cebador a concentración de 1 µM, 1,2 µl de Taq y 10 µl de ADN.

4.8.7 Ciclos empleados

El ciclo empleado para la realización del *housekeeping* viene reflejado en la siguiente tabla:

Ciclos	Temp. (°C)	Tiempo
1X	95°C	1 min
45X	94°C	4 seg
	57°C	4 seg
	72°C	3 seg
1X	72°C	1 min

Los ciclos de amplificación del gen 16S rRNA de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Neorickettsia* spp. y del gen ITS de *Bartonella* spp. eran los mismos, y están reflejados en la siguiente tabla:

Ciclos	Temp. (°C)	Tiempo
1X	95°C	2 min
55X	94°C	10 seg
	66°C	10 seg
	72°C	10 seg
1X	72°C	1 min

Para el gen RpoB de *Bartonella* spp. el ciclo cambiaba levemente, como se muestra a continuación:

Ciclos	Temp. (°C)	Tiempo
1X	95°C	2 min
55X	94°C	10 seg
	62°C	10 seg
	72°C	10 seg
1X	72°C	1 min

En los casos en los que fue necesaria la amplificación del gen 16S rRNA de *E. canis*, el ciclo consistió en lo siguiente:

Ciclos	Temp. (°C)	Tiempo
1X	95°C	2 min
55X	94°C	10 seg
	58°C	10 seg
	72°C	10 seg
1X	72°C	1 min

Para el operón groESL de *E. canis* y *A. platys* se empleó el siguiente ciclo:

Ciclos	Temp. (°C)	Tiempo
1X	95°C	1 min
55X	94°C	10 seg
	62°C	10 seg
	72°C	10 seg
1X	72°C	1 min

Para la amplificación de *N. risticii* se empleó el siguiente ciclo:

Ciclos	Temp. (°C)	Tiempo
1X	94°C	2 min
30X	94°C	1 min
	56°C	1 min
	72°C	1 min
1X	72°C	5 min

Para la amplificación del gen p44 de *A. phagocytophilum* se empleó una **PCR en tiempo real** con las siguientes condiciones:

Ciclos	Temp. (°C)	Tiempo
1X	95°C	10 seg
40X	94°C	10 seg
	60°C	30 seg
	72°C	30 seg

Para la amplificación del kDNA de *Leishmania* spp. se empleó un ciclo diferente:

Ciclos	Temp. (°C)	Tiempo
1X	94°C	4 min
55X	94°C	30 seg
	59°C	30 seg
	72°C	30 seg
1X	72°C	10 min

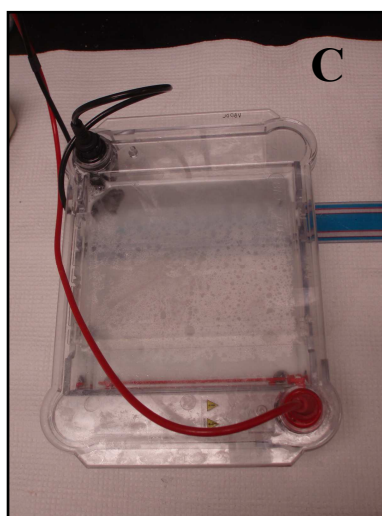
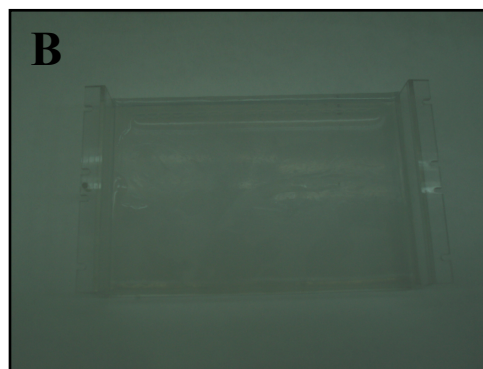
4.8.8 Lectura en gel de electroforesis

El producto amplificado era mezclado con un **tampón de carga**, compuesto por azul de bromofenol al 5%, xilencyanol al 0,25% y glicerol al 30%. Tras la mezcla, la concentración final a la que quedaba el tampón de carga era al 10%. Este tampón tiene como función la coloración de la mezcla para su visualización en el gel, así como una solidez que hace que al cargar esta mezcla en el gel quede al fondo de cada pocillo.

El **gel** de electroforesis se obtenía mezclando 100 ml de una solución de TAE a concentración 1X con agarosa (Lab. Conda, España). La agarosa es un polisacárido natural

que se disuelve por calentamiento y le confiere rigidez al gel. A mayor concentración de agarosa, mayor resistencia al avance de la muestra por el gel (Imagen 8). Así, en nuestro estudio se ha empleado una cantidad de 1,5 a 2 g de agarosa, según el tamaño del fragmento esperado. La solución de TAE al 1X se obtuvo a partir de una solución de TAE 50X compuesta a su vez por Trizma® Base (Sigma®, España), ácido acético glacial purísimo (Panreac Química, S. A., España) y EDTA a 0,5M y pH 8. A la mezcla de TAE 1X con agarosa se le añadían 2 µl de **Bromuro de Etidio** (Fisher Biotech, Wembley, Australia), que tiene como función la de unirse al ADN confiriéndole una fluorescencia al exponerlo a luz ultravioleta, permitiendo así la visualización de los fragmentos de ADN amplificados.

Imagen 8. A: Soporte para la colocación de geles para la electroforesis. B: Compartimento de gel de electroforesis. C: Cubeta de electroforesis en funcionamiento

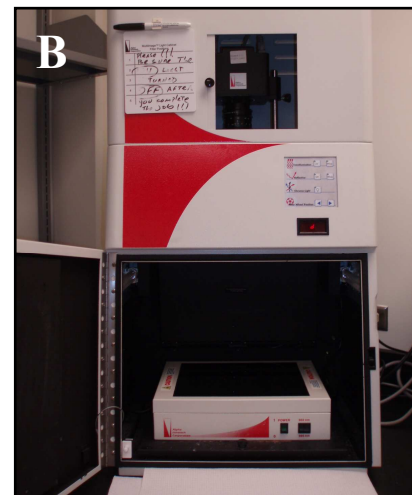
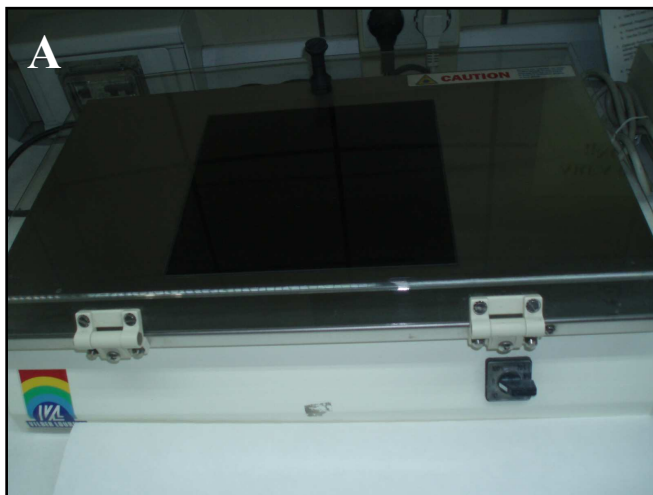


En cada pocillo del gel se cargaban 10 μ l de la mezcla compuesta por el ADN amplificado y el tampón de carga.

Para visualizar el tamaño de banda obtenido en el gel, se empleó en todos los casos un marcador de 100 pares de bases (Fermentas, Inc, Glen Burnie, Maryland, Estados Unidos).

La lectura del gel se realizó mediante visualización en el transiluminador de luz ultravioleta de Vilber Lourmat (Francia) y de Alpha Innotech Corporation (San Leandro, California, Estados Unidos), que permite la captación de imágenes en papel (Imagen 9).

Imagen 9. A: Transiluminador de luz ultravioleta de Vilber Lourmat. B: Transiluminador de luz ultravioleta de Alpha Innotech Corporation



4.8.9 Purificación del ADN amplificado y secuenciación

En aquellos casos en los que se obtuvo una banda en el gel que indicaba amplificación de ADN de algún organismo, se procedió a la purificación de dicho ADN empleando el kit de purificación “BioClean Columns” (Biotools Labs, S.A., Madrid, España), procediéndose a su secuenciación automática en Secugen (campus del CSIC de la Ciudad Universitaria de Madrid), empleando el secuenciador de ADN automático

ABI3100, usando el BigDye ® Terminator versión 3.1 (Applied Biosystems, Inc, Foster City, California, Estados Unidos).

En aquellos casos en los que se obtenían bandas inespecíficas a distintas alturas, se recogía directamente del gel el fragmento de interés y se procesaba dicho fragmento mediante el kit de purificación “QIAquick PCR Cleanup and gel extraction” (QIAGEN, Madrid, España).

4.8.10 Clonación en plásmidos

En algunos casos en los que se obtuvo amplificación, se efectuó la clonación de la misma en el plásmido pGEM-T® Easy Vector System (Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) y se procedió a su secuenciación en el centro “Davis Sequencing” (Davis, California, Estados Unidos).

4.8.11 Sensibilidad de la reacción de PCR

La sensibilidad de la reacción viene dada por la cantidad mínima de agente que es detectable mediante la técnica de PCR. A la hora de calcular la sensibilidad de la técnica de PCR, hemos tenido en cuenta que en la mayoría de los agentes empleamos como control positivo de la técnica bacterias incluidas en células de una línea celular específica para cada caso, por lo que el cálculo de dicha sensibilidad era aproximado. Para el cálculo de la sensibilidad, inicialmente se evaluó la concentración del agente (en el caso de *L. infantum*) o de células infectadas (en el resto de especies estudiadas) en la muestra madre empleada como control positivo. A continuación se realizó la extracción de ADN de modo habitual. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas 1:10 a partir de la solución madre hasta el valor 1×10^{-6} . Finalmente, se seleccionó la última muestra en la que se obtuvo amplificación y se procedió a la dilución 1:10 de ésta para obtener un valor más exacto de la concentración detectada por PCR. Se eligió la última dilución a la que se obtuvo un resultado positivo como la sensibilidad de la técnica. En último lugar, se realizaron los

cálculos oportunos para hallar el número de células infectadas, o directamente del agente, que podían detectarse mediante la PCR.

4.8.12 Especificidad de la reacción de PCR

Se consideró específica una reacción de PCR cuando se produjo la amplificación exclusivamente del fragmento que se quería amplificar al emplear cebadores específicos para dicho fragmento y cuando ésta se produjo exclusivamente a partir de muestras controles positivas.

Para la determinación de la especificidad de los protocolos de PCR usados en cada caso, se procedió a realizar cada uno de los protocolos de PCR empleados en el estudio con una serie de controles de ADN distintos al que se estaba amplificando en cada reacción y de ADN extraído a partir de cultivos sin infectar. Así, se fueron realizando todas las PCRs comentadas con anterioridad empleando como muestras los propios controles positivos de *E. canis*, *A. phagocytophilum*, *N. risticii*, *B. henselae* y *L. Infantum*, así como el ADN extraído a partir de las líneas celulares DH82, HL60, P388D1 y Vero sin infectar.

Posteriormente se procedió a la lectura de la técnica tras cargarse las muestras en gel de agarosa y someterse a electroforesis.

4.8.13 Árboles filogenéticos

Una vez obtenida la secuencia en los casos positivos mediante técnicas moleculares, con el fin de conocer la distancia genética con otras especies relacionadas y visualizar la similitud entre especies incluidas en el GenBank, se realizaron los árboles filogenéticos de cada especie amplificada por PCR y secuenciada. Para ello, se empleó en un primer momento el Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) para determinar la similitud entre especies, y posteriormente se empleó el programa Phylogeny.fr, modalidad TreeDyn, que analiza las relaciones filogenéticas entre distintas secuencias moleculares, para la creación de los árboles filogenéticos (Dereeper, 2008).

4.9 ESTUDIO ESTADÍSTICO

Todos los resultados obtenidos en el presente estudio fueron analizados por el Departamento de Apoyo a la Investigación del Área de Informática y Comunicaciones de la Universidad Complutense de Madrid.

Concretamente, con el análisis de los datos se pretendía realizar inicialmente una estadística descriptiva de la población de estudio, para luego buscar la posible presencia de asociaciones estadísticas entre la positividad a los cinco agentes objeto de estudio (*E. canis*, *A. phagocytophilum*, *N. risticii*, *L. infantum* y *B. henselae*) y todas las variables recogidas en cada caso.

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS 17.0 para Windows (SPSS, 2007). Los métodos estadísticos utilizados fueron los siguientes:

-Estadística **descriptiva** de las variables **cuantitativas** (procedimiento DESCRIPTIVE) para la descripción de las muestras: media, desviación estándar, máximo, mínimo, mediana, desviación estándar de la media, etc. (Ferrán, 1996).

-Estadística **descriptiva** de las variables **cualitativas** (procedimiento FREQUENCIES), con la obtención de frecuencias y porcentajes de las categorías. (Ferrán, 1996).

-Test de **Kolmogorov-Smirnov** para una muestra (procedimiento NPAR TESTS) para determinar si las variables cuantitativas del estudio provienen de una distribución normal. (Ferrán, 1996).

-Tablas de contingencia para la relación entre variables cualitativas (procedimiento CROSSTABS). Para contrastar la independencia o influencia entre dos variables cualitativas, se empleó el test de la chi cuadrado de Pearson (χ^2) con información en cada casilla de la tabla de contingencia del porcentaje en fila y los **residuos brutos** no

tipificados para ayudar a descubrir las tramas en los datos que contribuyen a una prueba de chi-cuadrado significativa. (Everitt, 1992, Ferrán, 1996). Las diferencias se consideraron significativas para un valor de $p < 0,05$. Para una distribución normal, los residuos brutos deben ser superiores a 1,96 e inferiores a -1,96 para que la frecuencia sea estadísticamente superior o inferior, respectivamente.

-Test no paramétrico para muestras no relacionadas con la prueba de **Mann-Whitney** y **Wilcoxon** (procedimiento NPAR TESTS) para la comparación de las variables cuantitativas entre las dos categorías de una variable cualitativa. (Ferrán, 1996).

-Test de la **t de Student** (procedimiento T-TEST) para la comparación de dos medias en variables cuantitativas, asumiendo o no igualdad de varianzas (método paramétrico). La igualdad de varianzas se contrasta con el **test de Levene** (lo que nos indicará si es más adecuado el test asumiendo varianzas iguales o desiguales). (Ferrán, 1996).

-**Árboles de decisión** (SPSS, 2007), que son gráficos que ilustran reglas de decisión de forma que parten de un nodo raíz que contiene todas las observaciones de la muestra y a medida que se desplaza por el árbol, los datos se ramifican en subconjuntos de datos que se excluyen mutuamente. Se realiza para segmentar, estratificar, predecir e identificar en un estudio multivariante interacciones de distintas variables en una misma muestra. En estos árboles, incluimos como variables dependientes a los cinco agentes objeto de estudio (*E. canis*, *A. phagocytophilum*, *N. risticii*, *L. infantum* y *B. henselae*) y como variables independientes las siguientes: estación, procedencia, raza, edad, sexo, castraciones, área y zona donde viven los animales, vivir dentro o fuera de casa, salidas al exterior, contacto con garrapatas, pulgas, pájaros, roedores y otros, tratamientos antiparasitarios, viajes, enfermedades concurrentes (incluyendo FeLV, FIV y PIF), signos clínicos (generales, digestivos, cardiorrespiratorios, oculares, locomotores, renales, neurológicos o de otro tipo), ser sintomático o no y alteraciones analíticas (rango de hematocrito, hemoglobina, glóbulos rojos, leucocitos, neutrófilos segmentados absolutos y relativos, linfocitos absolutos y relativos, plaquetas, proteínas totales, glucosa, urea, creatinina y ALT). El número mínimo de casos en cada nodo filial o casilla era de 65 casos, mientras que el número mínimo de casos en un nodo parental era de 20.

-***Odds ratio*** (OR) de subgrupos derivados de los árboles de decisión, realizado para aquellos nodos que presentan una frecuencia más elevada en cada análisis. Es un procedimiento para cuantificar la importancia de una asociación entre variables. El odds (ventaja) es otra forma de representar un riesgo, mediante el cociente entre el número de veces que ocurre el suceso frente a cuántas veces no ocurre.

5 RESULTADOS

5.1 DESCRIPCIÓN ESTADÍSTICA DE LA POBLACIÓN

En los materiales y métodos de la presente tesis se ha realizado la descripción de la reseña de los animales objeto del estudio (**procedencia, raza, sexo, edad y castraciones**). A continuación realizaremos la descripción estadística de otros factores cuya información se obtuvo a partir de la ficha diseñada para la realización de este estudio. Tal y como hemos indicado en el apartado de materiales y métodos, no fue posible en todos los casos recoger toda la información que se esperaba. Ello justifica que el valor muestral pueda ser diferente para cada una de las variables analizadas.

La Tabla y Figura 3 describen la distribución de la población en función del **mes** del año en el que fueron atendidos los gatos. Además, en la Tabla y Figura 4 observamos la distribución en función de la **estación** del año.

Tabla y Figura 3. Distribución de la población en función del mes del año

Mes	n	Porcentaje
Enero	73	10,7%
Febrero	82	12,1%
Marzo	67	9,9%
Abril	47	6,9%
Mayo	89	13,1%
Junio	82	12,1%
Julio	40	5,9%
Agosto	16	2,4%
Septiembre	26	3,8%
Octubre	51	7,5%
Noviembre	63	9,3%
Diciembre	44	6,5%
Total	680	100,0%

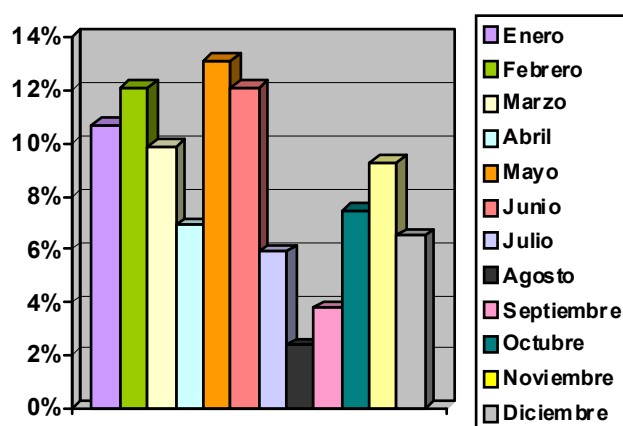
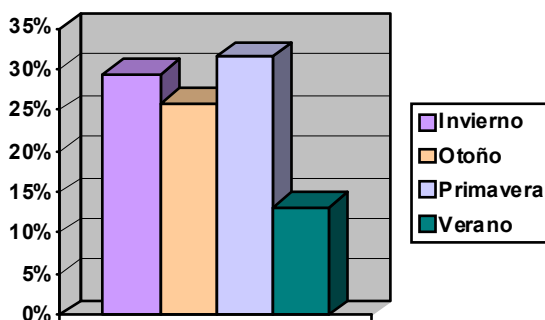


Tabla y Figura 4. Distribución de la población en función de la estación del año

Estación	n	Porcentaje
Primavera	214	31,5%
Verano	90	13,2%
Otoño	176	25,9%
Invierno	200	29,4%
Total	680	100%



En cuanto al **hábitat** de los animales, el 56,5% de los gatos vivían en un ámbito urbano, el 26,3% en un ámbito periurbano y el 17,2% en un ámbito rural. (Tabla 6).

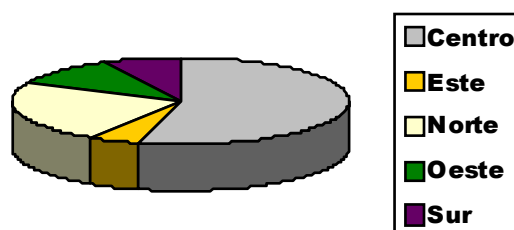
Tabla 6. Distribución de la población de gatos en función del ámbito donde vivían

Hábitat	n	Porcentaje
Urbano	266	56,5%
Rural	81	17,2%
Periurbano	124	26,3%
Total	471	100%

Según las **áreas geográficas** de la Comunidad de Madrid de la que procedían los animales, un 54,3% de los animales vivían en el área Centro, un 4,6% en el área Este, un 23,1% en el área Norte, un 10,5% en el área Oeste y un 7,5% en el área Sur (Tabla y Figura 5).

Tabla y Figura 5. Distribución de la población de gatos en función del área de residencia

Áreas	n	Porcentaje
Centro	247	54,3%
Este	21	4,6%
Norte	105	23,1%
Oeste	48	10,5%
Sur	34	7,5%
Total	455	100,0%



Además, según el **tipo de vivienda**, se observó que un 64,5% vivía en piso, un 13,9% en chalet, un 20,1% habitaban en la calle y un 1,5% en las protectoras (Tabla 7). Los animales que no salen de casa suponían un 50,7% de la población, mientras que los que salen con mayor o menor frecuencia de ella suponían un 49,3% (Tabla 8).

Tabla 7. Distribución de la población de gatos en función del tipo de vivienda

Tipo Vivienda	n	Porcentaje
Calle	109	20,1%
Chalet	75	13,9%
Piso	349	64,5%
Protectora	8	1,5%
Total	541	100,0%

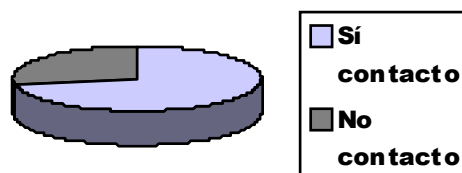
Tabla 8. Distribución de la población de gatos en función de las salidas al exterior de la vivienda

Salidas exterior	n	Porcentaje
Sí	247	49,3%
No	254	50,7%
Total	501	100%

Un 72,3% de los gatos habían tenido algún **contacto con otros animales**, tanto en la misma vivienda donde habitan como en otros lugares (Tabla y Figura 6).

Tabla y Figura 6. Distribución de la población de gatos en función del contacto con otros animales

Contacto	n	Porcentaje
Sí	374	72,3%
No	143	27,7%
Total	517	100%



En cuanto a la exposición a posibles **vectores**, un 7,7% había tenido contacto con garrapatas, un 15,8% con pulgas, un 28,3% con roedores, un 33,7% con pájaros y un 15% con otro tipo de invertebrados, como cucarachas, otros insectos, etc. (Tabla 9, Tabla 10, Tabla 11)

Tabla 9. Distribución de la población de gatos en función del contacto con garrapatas y del contacto con pulgas

Garrapatas	n	Porcentaje
Sí	34	7,7%
No	406	92,3%
Total	440	100%

Pulgas	n	Porcentaje
Sí	70	15,8%
No	372	84,2%
Total	442	100%

Tabla 10. Distribución de la población de gatos en función del contacto con roedores y con pájaros

Roedores	n	Porcentaje
Sí	125	28,3%
No	317	71,7%
Total	442	100%

Pájaros	n	Porcentaje
Sí	149	33,7%
No	293	66,3%
Total	442	100%

Tabla 11. Distribución de la población de gatos en función del contacto con otros invertebrados

Otros	n	Porcentaje
Sí	66	15%
No	373	85%
Total	439	100%

Tan sólo el 1,2% de los gatos había recibido una **transfusión** de sangre (Tabla 12).

Tabla 12. Distribución de la población de gatos en función de haber recibido una transfusión sanguínea

Transfusión	n	Porcentaje
Sí	5	1,2%
No	410	98,8%
Total	415	100%

En el 27,9% de los gatos incluidos en el estudio se aplicaba un **tratamiento antiparasitario** regularmente, que consistía en pipeta, collar antiparasitario, champú, spray o combinaciones de algunos de ellos, como se indica en la Tabla 13.

Tabla 13. Distribución de la población de gatos en función de haber recibido tratamiento antiparasitario externo

Tto. antiparasitario externo	n	Porcentaje
Sí	117	27,9%
No	303	72,1%
Total	420	100%

Tan sólo 13 gatos (3,1%) habían sido tratados con **doxiciclina** en los meses previos a la recogida de las muestras de cada animal (Tabla 14).

Tabla 14. Distribución de la población de gatos en función de haber recibido tratamiento previo con doxiciclina

Doxiciclina	n	Porcentaje
Sí	13	3,1%
No	403	96,9%
Total	416	100%

En cuanto a los **viajes** fuera de Madrid, a otras zonas de España o fuera de España, un 38,6% de los animales habían realizado tal tipo de viajes con sus dueños (Tabla y Figura 7)

Tabla y Figura 7. Distribución de la población de gatos en función de la realización de viajes fuera de Madrid

Viajes	n	Porcentaje
Sí	154	38,6%
No	245	61,4%
Total	399	100%



Las **enfermedades concurrentes** analizadas en los gatos fueron, en su mayoría, diferentes virosis, como la leucemia felina (FeLV) y la inmunodeficiencia felina (FIV). También se valoró la presencia del virus de la peritonitis infecciosa felina (PIF). Según esto, se detectó un 7,1% de positividad al FeLV, un 5,1% de positividad al FIV y un 3,6% de positividad al PIF (Tabla y Figura 8, Tabla 15, Tabla 16, Tabla 17).

Tabla y Figura 8. Distribución de la población de gatos en función de la presencia de enfermedades concurrentes

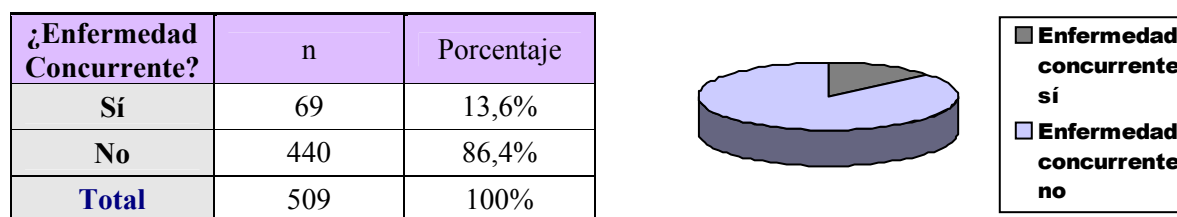


Tabla 15. Distribución de la población de gatos en función de la infección por FeLV

FeLV	n	Porcentaje
Sí	36	7,1%
No	468	92,9%
Total	504	100%

Tabla 16. Distribución de la población de gatos en función de la infección por FIV

FIV	n	Porcentaje
Sí	26	5,1%
No	480	94,9%
Total	506	100%

Tabla 17. Distribución de la población de gatos en función de la infección por PIF

PIF	n	Porcentaje
Sí	13	3,6%
No	347	96,4%
Total	360	100%

En cuanto a la presentación de **signos clínicos** en la población de estudio, un 33,2% de los gatos había presentado signos generales de enfermedad, un 32,1% signos de tipo digestivo, un 23,5% cardiorespiratorio, un 10,1% oculares, un 8% locomotores, un 22,3% renales, un 3,3% neurológicos y un 38,2% había presentado algún otro tipo de signos (Tabla 18). Se considera que un 71,3% de los animales presentaba algún tipo de signo clínico, mientras que un 28,7% eran asintomáticos (Tabla y Figura 9).

Tabla 18. Distribución de la población de gatos en función del padecimiento de signos generales, digestivos, cardiorrespiratorios, oculares, locomotores, renales, neurológicos y de otro tipo

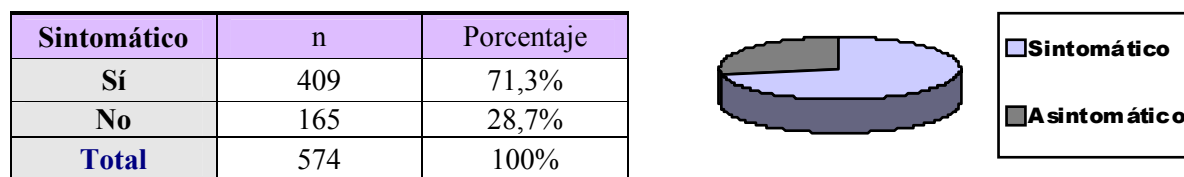
Signos generales	n	Porcentaje	Signos digestivos	n	Porcentaje
Sí	191	33,2%	Sí	184	32,1%
No	383	66,8%	No	390	67,9%
Total	574	100%	Total	574	100%

Signos cardiorres.	n	Porcentaje	Signos oculares	n	Porcentaje
Sí	135	23,5%	Sí	58	10,1%
No	439	76,5%	No	516	89,9%
Total	574	100%	Total	574	100%

Signos locomot.	n	Porcentaje	Signos renales	n	Porcentaje
Sí	46	8%	Sí	128	22,3%
No	528	92%	No	446	77,7%
Total	574	100%	Total	574	100%

Signos neurológic	n	Porcentaje	Otros signos	n	Porcentaje
Sí	19	3,3%	Sí	219	38,2%
No	555	96,7%	No	355	61,8%
Total	574	100%	Total	574	100%

Tabla y Figura 9. Distribución de la población de gatos en función del hecho de ser sintomático o no



Como hemos mencionado previamente, los **valores analíticos** se evaluaron como variables cuantitativas y dentro de unos rangos (alto, bajo y normal). La descripción de porcentajes de cada uno de los valores analíticos agrupados en rangos se indica en las siguientes tablas (Tabla 19).

Tabla 19. Distribución de la población de gatos en función de los valores analíticos observados

Rango	Htc		Hb		GR		VCM		HCM	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Alto	30	6,1%	21	4,3%	91	18,7%	10	2,0%	12	2,4%
Bajo	89	18,2%	178	36,4%	29	5,9%	103	21,1%	76	15,6%
Normal	370	75,7%	290	59,3%	369	75,4%	376	77,0%	401	82,0%
Total	489	100%	489	100%	489	100%	489	100%	489	100%

Rango	CCMH		GB		N.seg		N.seg%	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Alto	11	2,3%	93	19,0%	68	13,8%	146	29,8%
Bajo	17	3,5%	67	13,8%	44	9,1%	29	5,9%
Normal	461	94,2%	329	67,2%	377	77,1%	314	64,4%
Total	489	100%	489	100%	489	100%	489	100%

Rango	Linf		Linf%		Mon		Mo%	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Alto	10	2,2%	40	8,2%	39	8%	77	15,7%
Bajo	151	30,8%	164	33,5%				
Normal	328	67,0%	285	58,4%	450	92%	412	84,3%
Total	489	100%	489	100%	489	100%	489	100%

	Eo		Eo%		Plaq		PT		Glucosa	
Rango	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Alto	22	4,5%	42	8,6%	14	8%	153	32,8%	145	36,1%
Bajo			51	10,4%	92	52,9%	40	8,7%	4	1,0%
Normal	467	95,5%	396	81,0%	68	39,1%	273	58,5%	253	62,9%
Total	489	100%	489	100%	174	100%	466	100%	402	100%

	Urea		Creat		ALT	
Rango	n	%	n	%	n	%
Alto	111	23,9%	85	18,2%	79	17,0%
Bajo	79	16,9%	18	3,9%	8	1,7%
Normal	276	59,2%	363	77,9%	379	81,3%
Total	466	100%	466	100%	466	100%

Htc: hematocrito

Hb: hemoglobina

GR: glóbulos rojos

VCM: volumen corpuscular medio

HCM: hemoglobina corpuscular media

CCMH: concentración media de hemoglobina corpuscular

GB: glóbulos blancos

N. seg: neutrófilos segmentados

N. seg%: neutrófilos segmentados, porcentaje

Linf: linfocitos

Linf%: linfocitos, porcentaje

Mon: monocitos

Mon%: monocitos, porcentaje

Eo: eosinófilos

Eo%: eosinófilos, porcentaje

Plaq: plaquetas

PT: proteínas totales

Gluc: glucosa

Los valores medios y las desviaciones típicas de las variables analíticas vienen reflejados en la Tabla 20.

Tabla 20. Valores medios y desviaciones típicas de las variables analíticas

Valores analíticos	n	Media	Desv. típica
Hematocrito	489	35,45	7,699
Hemoglobina	489	11,543	2,4855
Glóbulos rojos	489	8,3675	1,97321
VCM	489	42,781	5,5312
HCM	489	13,980	1,6825
CCMH	489	32,488	1,6204
Glóbulos blancos	489	10,999	8,1572
Neutrófilos(segment)	489	7453,30	6176,936
Neutrófilos seg %	489	64,61	17,893
Linfocitos	489	2835,87	5238,748
Linfocitos %	489	28,70	17,507
Monocitos	489	319,96	372,751
Monocitos %	489	2,77	2,007
Eosinófilos	489	581,15	673,000
Eosinófilos %	489	6,24	5,236
Plaquetas (x1000)	174	350,84	323,729
Proteínas totales	466	7,15	1,020
Glucosa	402	137,02	53,058
Urea	466	71,42	76,146
Creatinina	466	1,828	2,5604
ALT(GPT)	466	42,96	54,810

5.2 RELACIÓN ENTRE LA SEROPOSITIVIDAD A LOS DISTINTOS AGENTES ESTUDIADOS Y DIFERENTES VARIABLES EN LA POBLACIÓN ANALIZADA

Inicialmente incluiremos los resultados del estudio estadístico para cada agente estudiado por separado y finalmente los relacionados con la seropositividad a más de un agente.

5.2.1 Seropositividad a *Ehrlichia canis*

De todos los gatos analizados, 67 fueron serológicamente positivos a *E. canis*, con lo que el valor de seroprevalencia frente a este agente en los gatos objeto de estudio fue del $9,9 \pm 1,1\%$. Un 5,4% (n=37) de ellos tuvieron un título de 1:40, un 3,8% (n=26) de 1:80, un 0,3% (n=2) de 1: 160 y un 0,3% (n=2) de 1:320, tal y como se muestra en la Tabla 21.

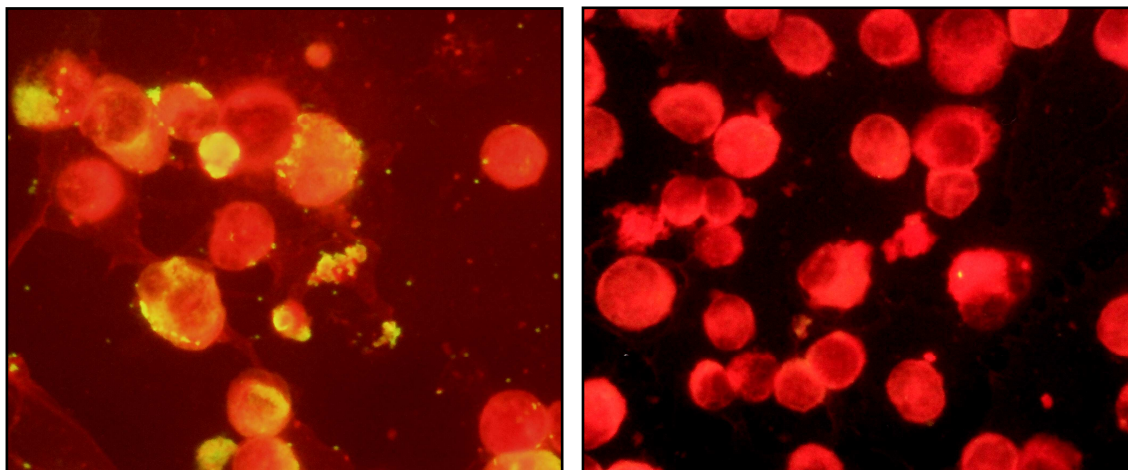
Tabla 21. Seroprevalencia frente a *E. canis*

Titulo <i>E. canis</i>	n	Porcentaje
Negativos	613	90,1%
1:40	37	5,4%
1:80	26	3,8%
1:160	2	0,3%
1:320	2	0,3%
Total	680	100%

En cuanto a las dos grandes subpoblaciones de gatos, observamos que de los animales procedentes de clínica, un 10,8% (n=58) fueron seropositivos a *E. canis*, mientras que de los procedentes de la calle, lo fueron un 6,4% (n=9).

Las imágenes muestran reacción serológica positiva y negativa mediante la técnica de IFI frente a este agente empleando muestras de gato (Imagen 10).

Imagen 10. Imágenes de IFI positiva y negativa para *E. canis* en gatos de nuestro estudio (40X)



A continuación, vamos a detallar los resultados estadísticos obtenidos en la valoración de asociaciones entre la seropositividad a *E. canis* y las diferentes variables estudiadas.

5.2.1.1 Relación entre la seropositividad a *E. canis* y la procedencia, raza, sexo, edad y castraciones

Se ha observado que existe una influencia significativa al 95% de intervalo de confianza de la **raza** del animal en la seropositividad a *E. canis* ($p=0,049$). Así, parece que existe una mayor seropositividad en los gatos de raza Siamés, y una mayor seronegatividad entre los Comunes Europeos, si bien hay que tener en cuenta que algunas razas vienen representadas por un bajo número de animales, habiendo un número representativo de animales tan sólo en las razas Persa, Siamés y Común Europeo, lo que nos puede haber influido en los resultados estadísticos (Tabla 22).

Tabla 22. Relación entre la seropositividad a *E. canis* y la raza

		<i>E. canis</i> IFI		
		Negativo	Positivo	Total
Raza	Abisinio	n	0	1
		Porcentaje	,0%	100,0%
		Residuos corregidos	-,9	,9
	Angora Turco	n	3	0
		Porcentaje	100,0%	,0%
		Residuos corregidos	,3	-,3
	A. Ruso	n	4	0
		Porcentaje	100%	,0%
		Residuos corregidos	,4	-,4
	Bombay	n	1	0
		Porcentaje	100,0%	,0%
		Residuos corregidos	,1	-,1
	B. Noruega	n	4	1
		Porcentaje	80,0%	20,0%
		Residuos corregidos	-,5	,5
	British	n	3	0
		Porcentaje	100,0%	,0%
		Residuos corregidos	,3	-,3
	C. Azul	n	0	1
		Porcentaje	,0%	100,0%
		Residuos corregidos	-,9	,9
	Charplaninatz	n	1	0
		Porcentaje	100,0%	,0%
		Residuos corregidos	,1	-,1
	C. Europeo	n	424	39
		Porcentaje	91,6%	8,4%
		Residuos corregidos	5,3	-5,3
	Esfinge	n	1	0
		Porcentaje	100,0%	,0%
		Residuos corregidos	,1	-,1
	Maine Coon	n	3	0
		Porcentaje	100,0%	,0%
		Residuos corregidos	,3	-,3
	Persa	n	50	7
		Porcentaje	87,7%	12,3%
		Residuos corregidos	-1,5	1,5
	Siamés	n	64	10
		Porcentaje	86,5%	13,5%
		Residuos corregidos	-2,9	2,9
	Total	n	558	59
		Porcentaje	90,4%	9,6%

(p=0,049)

Al considerarla como variable cuantitativa, se ha encontrado una influencia de la **edad** en la seropositividad a este agente ($p=0,019$), mostrando una edad mayor los casos seropositivos (Tabla 23). Al considerar esta variable como cualitativa no se ha encontrado ninguna asociación estadística ($p=0,172$).

Tabla 23. Relación entre la seropositividad a *E. canis* y la edad como variable cuantitativa

Wilcoxon	<i>E. canis</i> IFI	n	Rango promedio	Suma de rangos
Edad	negativo	522	284,05	148274,50
	positivo	58	348,54	20215,50
	Total	580		

($p=0,019$)

No se ha observado asociación estadística con ninguna de las restantes variables analizadas en este grupo, como son la procedencia ($p=0,120$), sexo ($p=0,859$) o castraciones ($p=0,067$).

5.2.1.2 Relación entre la seropositividad a *E. canis* y diferentes datos del entorno

Se ha constatado igualmente una influencia significativa en cuanto al **mes** de recogida de las muestras ($p=0,022$), observándose una mayor seropositividad a *E. canis* en los meses de mayo y noviembre, siendo ésta menor en los meses de marzo, abril y diciembre (Tabla 24).

Tabla 24. Relación entre la seropositividad a *E. canis* y el mes

			<i>E. canis</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
Mes	Enero	n	66	7	73
		Porcentaje	90,4%	9,6%	100,0%
		Residuos corregidos	,2	-,2	
	febrero	n	74	8	82
		Porcentaje	90,2%	9,8%	100,0%
		Residuos corregidos	,1	-,1	
	Marzo	n	64	3	67
		Porcentaje	95,5%	4,5%	100,0%
		Residuos corregidos	3,6	-3,6	
	Abril	n	45	2	47
		Porcentaje	95,7%	4,3%	100,0%
		Residuos corregidos	2,6	-2,6	
	Mayo	n	70	19	89
		Porcentaje	78,7%	21,3%	100,0%
		Residuos corregidos	-10,2	10,2	
	Junio	n	75	7	82
		Porcentaje	91,5%	8,5%	100,0%
		Residuos corregidos	1,1	-1,1	
	Julio	n	38	2	40
		Porcentaje	95,0%	5,0%	100,0%
		Residuos corregidos	1,9	-1,9	
	Agosto	n	14	2	16
		Porcentaje	87,5%	12,5%	100,0%
		Residuos corregidos	-,4	,4	
	Septiembre	n	25	1	26
		Porcentaje	96,2%	3,8%	100,0%
		Residuos corregidos	1,6	-1,6	
	Octubre	n	46	5	51
		Porcentaje	90,2%	9,8%	100,0%
		Residuos corregidos	,0	,0	
	Noviembre	n	54	9	63
		Porcentaje	85,7%	14,3%	100,0%
		Residuos corregidos	-2,8	2,8	
	Diciembre	n	42	2	44
		Porcentaje	95,5%	4,5%	100,0%
		Residuos corregidos	2,3	-2,3	
	Total	n	613	67	680
		Porcentaje	90,1%	9,9%	100,0%

(p=0,022)

El **tipo de vivienda** en el que habitaban los animales (p=0,042) y la probabilidad de **salir al exterior** de la vivienda (p=0,006) también parecen influir en la seropositividad a *E. canis* (Tabla 25, Tabla 26). Así, los animales que vivían en piso eran seropositivos en un mayor porcentaje a este agente; además, hay un mayor porcentaje de animales seropositivos que no habían salido de casa.

Tabla 25. Relación entre la seropositividad a *E. canis* y el tipo de vivienda

			<i>E. canis</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
Tipo Vivienda	Calle	n	105	4	109
		Porcentaje	96,3%	3,7%	100,0%
		Residuos corregidos	7,5	-7,5	
	Chalet	n	70	5	75
		Porcentaje	93,3%	6,7%	100,0%
		Residuos corregidos	2,9	-2,9	
	Piso	n	302	47	349
		Porcentaje	86,5%	13,5%	100,0%
		Residuos corregidos	-10,2	10,2	
	Protectora	n	7	1	8
		Porcentaje	87,5%	12,5%	100,0%
		Residuos corregidos	-,2	,2	
	Total	n	484	57	541
		Porcentaje	89,5%	10,5%	100,0%

(p=0,042)

Tabla 26. Relación entre la seropositividad a *E. canis* y las salidas al exterior de la vivienda

			<i>E. canis</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
Sale de casa	No	n	220	34	254
		Porcentaje	86,6%	13,4%	100,0%
		Residuos corregidos	-9,2	9,2	
	Sí	n	232	15	247
		Porcentaje	93,9%	6,1%	100,0%
		Residuos corregidos	9,2	-9,2	
	Total	n	452	49	501
		Porcentaje	90,2%	9,8%	100,0%

(p=0,006)

Además, el hecho de tener algún tipo de contacto con **pájaros** del entorno también tiene una significación estadística en la seropositividad a *E. canis* (p=0,019); así, parece que existe un menor contacto con pájaros entre los animales seropositivos (Tabla 27).

Tabla 27. Relación entre la seropositividad a *E. canis* y el contacto con pájaros

			<i>E. canis</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
Contacto pájaros	No	n	251	42	293
		Porcentaje	85,7%	14,3%	100,0%
		Residuos corregidos	-7,5	7,5	
	Sí	n	139	10	149
		Porcentaje	93,3%	6,7%	100,0%
		Residuos corregidos	7,5	-7,5	
	Total	n	390	52	442
		Porcentaje	88,2%	11,8%	100,0%
	(p=0,019)				

No se ha observado asociación estadística con ninguna de las restantes variables analizadas, como son la estación del año en que se recogieron las muestras ($p=0,833$), el área urbana, rural o periurbana donde vivían los animales ($p=0,215$), así como la zona de Madrid en la que habitaban ($p=0,250$) o haber viajado fuera de Madrid ($p=0,470$). Tampoco se ha detectado asociación estadística entre la seropositividad a *E. canis* y el contacto con otros animales ($p=0,237$) o la presencia de garrapatas, pulgas, roedores u otros ($p=0,587$, $p=0,924$, $p=0,061$, y $p=0,940$, respectivamente). Tampoco se ha observado asociación con el hecho de haber recibido transfusión de sangre ($p=0,405$), recibir tratamientos antiparasitarios externos ($p=0,158$) o haber sido tratados con doxiciclina ($p=0,186$).

5.2.1.3 Relación entre la seropositividad a *E. canis* y la presencia de enfermedades concurrentes

No se ha observado ninguna asociación entre la seropositividad a *E. canis* y la presentación de enfermedades concurrentes, del tipo de FeLV, FIV o PIF ($p=0,137$, $p=0,290$ y $p=0,669$, respectivamente).

5.2.1.4 Relación entre la seropositividad a *E. canis* y el cuadro clínico

Se ha observado una influencia significativa entre la seropositividad a este agente y el hecho de no padecer ningún tipo de **síntoma clínico** considerado como de tipo **general** ($p=0,038$) (Tabla 28).

Tabla 28. Relación entre la seropositividad a *E. canis* y la presentación de signos generales

			<i>E. canis</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
Síntomas generales	No	n	335	48	383
		Porcentaje	87,5%	12,5%	100,0%
		Residuos corregidos	-7,2	7,2	
	Sí	n	178	13	191
		Porcentaje	93,2%	6,8%	100,0%
		Residuos corregidos	7,2	-7,2	
	Total	n	513	61	574
		Porcentaje	89,4%	10,6%	100,0%
(p=0,038)					

No se han observado asociaciones con la presencia de signos digestivos ($p=0,652$), cardiorrespiratorios ($p=0,912$), oculares ($p=0,061$), locomotores ($p=0,150$), renales ($p=0,897$), neurológicos ($p=0,988$) o de otro tipo ($p=0,061$), ni con el hecho de ser sintomático o no serlo ($p=0,646$).

5.2.1.5 Relación entre la seropositividad a *E. canis* y el hemograma y análisis bioquímico sanguíneo

Se ha observado una asociación estadística entre la seropositividad a *E. canis* y la presencia de un rango de **hematocrito** elevado en la prueba de chi cuadrado ($p=0,049$) (Tabla 29).

Tabla 29. Relación entre la seropositividad a *E. canis* y el rango de hematocrito como variable cualitativa

			<i>E. canis</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
Rango hematocrito	Alto	n	23	7	30
		Porcentaje	76,7%	23,3%	100,0%
		Residuos corregidos	-3,9	3,9	
	Bajo	n	82	7	89
		Porcentaje	92,1%	7,9%	100,0%
		Residuos corregidos	2,3	-2,3	
	Normal	n	333	37	370
		Porcentaje	90,0%	10,0%	100,0%
		Residuos corregidos	1,6	-1,6	
	Total	n	438	51	489
		Porcentaje	89,6%	10,4%	100,0%

(p=0,049)

Cuando valoramos esta variable como valor cuantitativo, no observamos tal asociación (p=0,645).

Además, se ha visto una asociación estadística entre la seropositividad a *E. canis* y valores de **proteínas totales** altos, al considerarlas tanto como valor cualitativo como cuantitativo (p=0,004 y p=0,014) (Tabla 30, Tabla 31).

Tabla 30. Relación entre la seropositividad a *E. canis* y las proteínas totales como variable cualitativa

			<i>E. canis</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
Rango proteínas totales	Alto	n	128	25	153
		Porcentaje	83,7%	16,3%	100,0%
		Residuos corregidos	-9,6	9,6	
	Bajo	n	38	2	40
		Porcentaje	95%	5%	100,0%
		Residuos corregidos	1,6	-1,6	
	Normal	n	256	17	273
		Porcentaje	93,8%	6,2%	100,0%
		Residuos corregidos	8,0	-8,0	
	Total	n	422	44	466
		Porcentaje	90,6%	9,4%	100,0%

(p=0,004)

Tabla 31. Relación entre la seropositividad a *E. canis* y las proteínas totales como variable cuantitativa

Wilcoxon	<i>E. canis</i> IFI	n	Rango promedio	Suma de rangos
PT	negativo	422	213,73	84422,00
	positivo	44	264,49	10844,00
	Total	466		

(p=0,014)

También se ha observado una asociación entre la seropositividad a *E. canis* y un rango de **creatinina** alto tanto en la prueba de chi cuadrado como cuando valoramos este valor de forma cuantitativa (p=0,025 y p=0,001) (Tabla 32, Tabla 33).

Tabla 32. Relación entre la seropositividad a *E. canis* y el valor de creatinina como variable cualitativa

			<i>E. canis</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
Rango creatinina	Alto	n	71	14	85
		Porcentaje	83,5%	16,5%	100,0%
		Residuos corregidos	-6,0	6,0	
	Bajo	n	18	0	18
		Porcentaje	100,0%	,0%	100,0%
		Residuos corregidos	1,7	-1,7	
	Normal	n	333	30	363
		Porcentaje	91,7%	8,3%	100,0%
		Residuos corregidos	4,3	-4,3	
	Total	n	422	44	466
		Porcentaje	90,6%	9,4%	100,0%

(p=0,025)

Tabla 33. Relación entre la seropositividad a *E. canis* y el valor de creatinina como variable cuantitativa

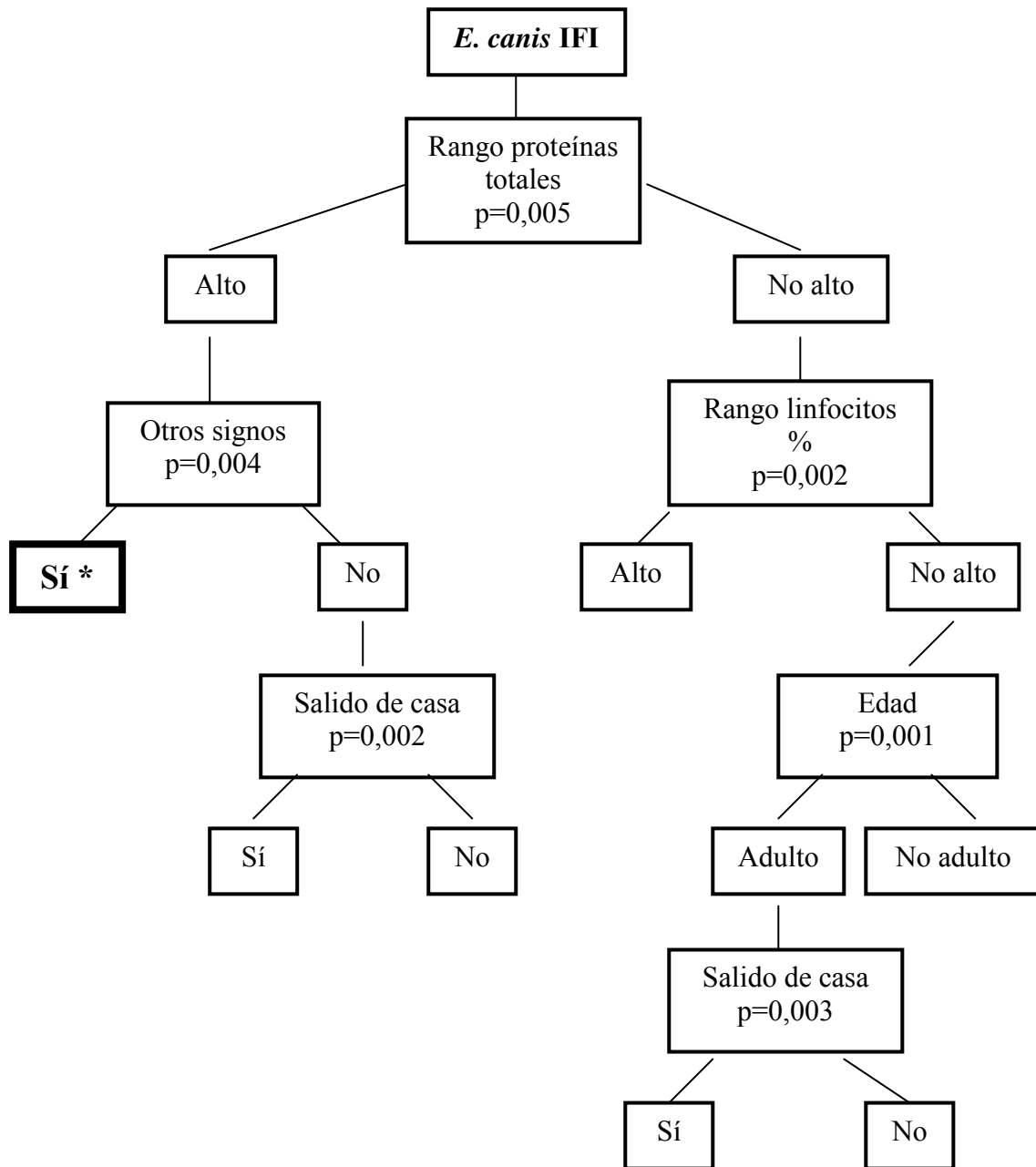
Wilcoxon	<i>E. canis</i> IFI	n	Rango promedio	Suma de rangos
Creatinina	negativo	422	226,91	95754,50
	positivo	44	296,74	13056,50
	Total	466		

(p=0,001)

En cuanto a los demás datos analíticos recogidos considerados tanto como variables cuantitativas como cualitativas, no se ha observado asociaciones con el valor de hemoglobina ($p=0,096$ y $p=0,662$), glóbulos rojos ($p=0,269$ y $p=0,155$), VCM ($p=0,785$ y $p=0,519$), HCM ($p=0,437$ y $p=0,760$), CCMH ($p=0,303$ y $p=0,327$), leucocitos ($p=0,538$ y $p=0,640$), valor absoluto ($p=0,665$ y $p=0,857$) y relativo ($p=0,769$ y $p=0,826$) de neutrófilos, el valor absoluto ($p=0,961$ y $p=0,885$) y relativo ($p=0,469$ y $p=0,423$) de linfocitos, el valor absoluto ($p=0,733$ y $p=0,403$) y relativo ($p=0,955$ y $p=0,744$) de monocitos, el valor absoluto ($p=0,192$ y $p=0,524$) y relativo ($p=0,451$ y $p=0,810$) de eosinófilos, el recuento de plaquetas ($p=0,355$ y $p=0,217$) y los valores de glucosa ($p=0,537$ y $p=0,619$), urea ($p=0,976$ y $p=0,959$) o ALT ($p=0,623$ y $p=0,333$).

5.2.1.6 Árboles de decisión

Cuando se efectuó el análisis estadístico realizando un árbol de decisión, se observaron los siguientes resultados:



* Porcentaje de seropositivos: 19,3%. *Odd's ratio*: 2,72

El número de nodos o casillas obtenido fue de 13 (del 0 al 12). El número de nodos terminales fue de 7. La profundidad fue de 4 niveles. En dicho árbol de decisión, el mayor porcentaje de animales seropositivos (**19,3%**) lo encontramos cuando valoramos conjuntamente el valor de proteínas elevadas y la presencia de otro tipo de signos clínicos. La *Odd's ratio* para este caso fue de 2,72.

5.2.2 Seropositividad a *A. phagocytophilum*

La seroprevalencia de *A. phagocytophilum* en la población de estudio fue del $8,4 \pm 1,1\%$, esto es, 57 gatos presentan reacción serológica frente a este agente mediante la técnica de IFI. El 5,6% (n=38) de los seropositivos tuvieron un título de 1:40, el 2,5% (n=17) de 1:80 y el 0,3% (n= 2) de 1: 160 (Tabla 34).

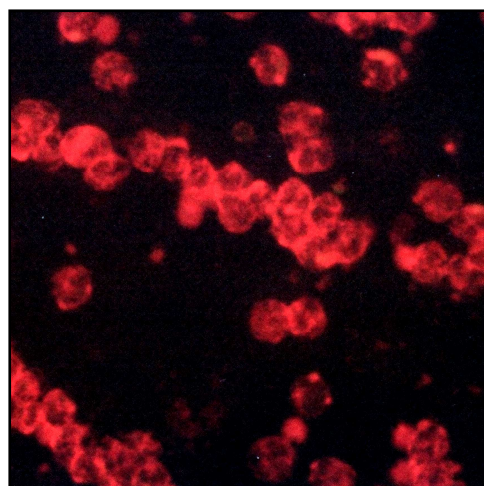
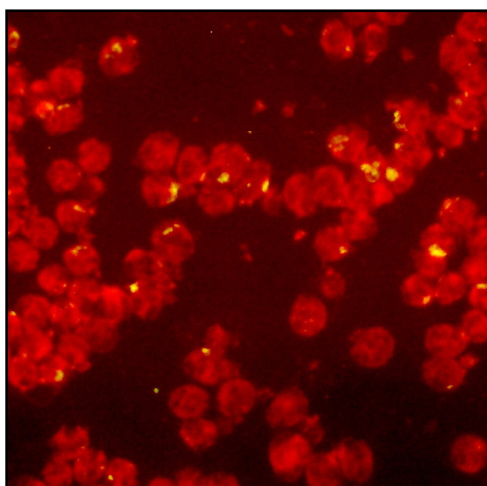
Tabla 34. Seroprevalencia frente a *A. phagocytophilum*

Titulo <i>A. phagocytophilum</i>	n	Porcentaje
Negativos	623	91,6%
1:40	38	5,6%
1:80	17	2,5%
1:160	2	0,3%
Total	680	100%

En las subpoblaciones de gatos, observamos que un 9,8% (n=53) de los animales procedentes de clínica fueron seropositivos a *A. phagocytophilum*, mientras que de los callejeros lo fueron un 2,8% (n=4).

Las imágenes muestran reacción serológica positiva y negativa mediante IFI frente a este agente empleando muestras de gato (Imagen 11).

Imagen 11. Imágenes serológicas positiva y negativa de *A. phagocytophilum* en gatos de nuestro estudio (40X)



5.2.2.1 Relación entre la seropositividad a *A. phagocytophilum* y la procedencia, raza, sexo, edad y castraciones

Se ha observado que la **procedencia** del animal influye estadísticamente en la seropositividad a *A. phagocytophilum* ($p=0,008$). Así, un mayor porcentaje de animales seropositivos proceden de clínica (Tabla 35).

Tabla 35. Relación entre la seropositividad a *A. phagocytophilum* y la procedencia como variable cualitativa

			<i>A. phagocytophilum</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
Procedencia	Callejero	n	137	4	141
		Porcentaje	97,2%	2,8%	100,0%
		Residuos corregidos	7,8	-7,8	
	Clínica	n	486	53	539
		Porcentaje	90,2%	9,8%	100,0%
		Residuos corregidos	-7,8	7,8	
	Total	n	623	57	680
		Porcentaje	91,6%	8,4%	100,0%

($p=0,008$)

No se ha observado asociación estadística con ninguna de las restantes variables analizadas en este grupo, como son la raza ($p=0,453$), el sexo ($p=0,586$), la edad evaluada cualitativa y cuantitativamente ($p=0,782$ y $p=0,209$) o las castraciones ($p=0,803$).

5.2.2.2 Relación entre la seropositividad a *A. phagocytophilum* y diferentes datos del entorno

El **mes** y la **estación** del año de recogida de las muestras influyen en la seropositividad a *A. phagocytophilum* ($p=0,024$ y $p=0,006$, respectivamente), observándose un mayor porcentaje de seropositivos a este agente en el mes de noviembre, siendo éste menor en febrero, marzo y julio. En cuanto a la estación del año, en otoño hay más casos seropositivos (Tabla 36, Tabla 37).

Tabla 36. Relación entre la seropositividad a *A. phagocytophilum* y el mes de recogida de muestras

			<i>A. phagocytophilum</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
Mes	Enero	n	65	8	73
		Porcentaje	89,0%	11,0%	100,0%
		Residuos corregidos	-1,9	1,9	
	Febrero	n	80	2	82
		Porcentaje	97,6%	2,4%	100,0%
		Residuos corregidos	4,9	-4,9	
	Marzo	n	64	3	67
		Porcentaje	95,5%	4,5%	100,0%
		Residuos corregidos	2,6	-2,6	
	Abril	n	44	3	47
		Porcentaje	93,6%	6,4%	100,0%
		Residuos corregidos	,9	-,9	
	Mayo	n	81	8	89
		Porcentaje	91,0%	9,0%	100,0%
		Residuos corregidos	-,5	,5	
	Junio	n	77	5	82
		Porcentaje	93,9%	6,1%	100,0%
		Residuos corregidos	1,9	-1,9	
	Julio	n	39	1	40
		Porcentaje	97,5%	2,5%	100,0%
		Residuos corregidos	2,4	-2,4	
	Agosto	n	16	0	16
		Porcentaje	100,0%	,0%	100,0%
		Residuos corregidos	1,3	-1,3	
	Septiembre	n	22	4	26
		Porcentaje	84,6%	15,4%	100,0%
		Residuos corregidos	-1,8	1,8	
	Octubre	n	45	6	51
		Porcentaje	88,2%	11,8%	100,0%
		Residuos corregidos	-1,7	1,7	
	Noviembre	n	51	12	63
		Porcentaje	81,0%	19,0%	100,0%
		Residuos corregidos	-6,7	6,7	
	Diciembre	n	39	5	44
		Porcentaje	88,6%	11,4%	100,0%
		Residuos corregidos	-1,3	1,3	
	Total	n	623	57	680
		Porcentaje	91,6%	8,4%	100,0%

(p=0,024)

Tabla 37. Relación entre la seropositividad a *A. phagocytophilum* y la estación

			<i>A. phagocytophilum</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
Estación	Invierno	n	188	12	200
		Porcentaje	94,0%	6,0%	100,0%
		Residuos corregidos	4,8	-4,8	
	Otoño	n	151	25	176
		Porcentaje	85,8%	14,2%	100,0%
		Residuos corregidos	-10,2	10,2	
	Primavera	n	197	17	214
		Porcentaje	92,1%	7,9%	100,0%
		Residuos corregidos	,9	-,9	
	Verano	n	87	3	90
		Porcentaje	96,7%	3,3%	100,0%
		Residuos corregidos	4,5	-4,5	
	Total	n	623	57	680
		Porcentaje	91,6%	8,4%	100,0%

(p=0,006)

Existe también una asociación estadística entre las **salidas al exterior** de la vivienda y la seropositividad a *A. phagocytophilum* (p=0,043) (Tabla 38). Así, los animales seropositivos han salido menos de casa que los seronegativos.

Tabla 38. Relación entre la seropositividad a *A. phagocytophilum* y las salidas al exterior de la vivienda

			<i>A. phagocytophilum</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
Salidas al exterior	No	n	223	31	254
		Porcentaje	87,8%	12,2%	100,0%
		Residuos corregidos	-6,7	6,7	
	Sí	n	230	17	247
		Porcentaje	93,1%	6,9%	100,0%
		Residuos corregidos	6,7	-6,7	
	Total	n	453	48	501
		Porcentaje	90,4%	9,6%	100,0%

(p=0,043)

No se ha observado asociación estadística con ninguna de las restantes variables analizadas, como son el área urbana, rural o periurbana donde vivían los animales (p=0,145), así como la zona de Madrid en la que habitan (p=0,101), el tipo de vivienda (p=0,135), el contacto con otros animales (p=0,411) y la presencia de garrapatas, pulgas, roedores, pájaros u otros (p=0,137, p=0,707, p=0,800, p=0,782 y p=0,062, respectivamente). Tampoco se ha observado asociación con el hecho de haber recibido

transfusión de sangre ($p=0,438$), presentar tratamientos antiparasitarios externos ($p=0,130$), haber sido tratados con doxiciclina ($p=0,208$) o haber viajado fuera de Madrid ($p=0,747$).

5.2.2.3 Relación entre la seropositividad a *A. phagocytophilum* y la presencia de enfermedades concurrentes

No se han observado asociaciones entre la seropositividad a este agente y el padecimiento de enfermedades concurrentes causadas por FeLV, FIV o PIF ($p=0,965$, $p=0,398$ y $p=0,221$).

5.2.2.4 Relación entre la seropositividad a *A. phagocytophilum* y el cuadro clínico

Los animales seropositivos a este agente padecían signos **locomotores** con mayor probabilidad que los seronegativos ($p=0,035$) (Tabla 39).

Tabla 39. Relación entre la seropositividad a *A. phagocytophilum* y la presentación de signos locomotores

			<i>A. phagocytophilum</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
Signos locomotores	No	n	485	43	528
		Porcentaje	91,9%	8,1%	100,0%
		Residuos corregidos	3,9	-3,9	
	Sí	n	38	8	46
		Porcentaje	82,6%	17,4%	100,0%
		Residuos corregidos	-3,9	3,9	
	Total	n	523	51	574
		Porcentaje	91,1%	8,9%	100,0%

($p=0,035$)

No se han observado asociaciones con los restantes signos clínicos, como son los generales ($p=0,223$), digestivos ($p=0,251$), cardiorrespiratorios ($p=0,999$), oculares

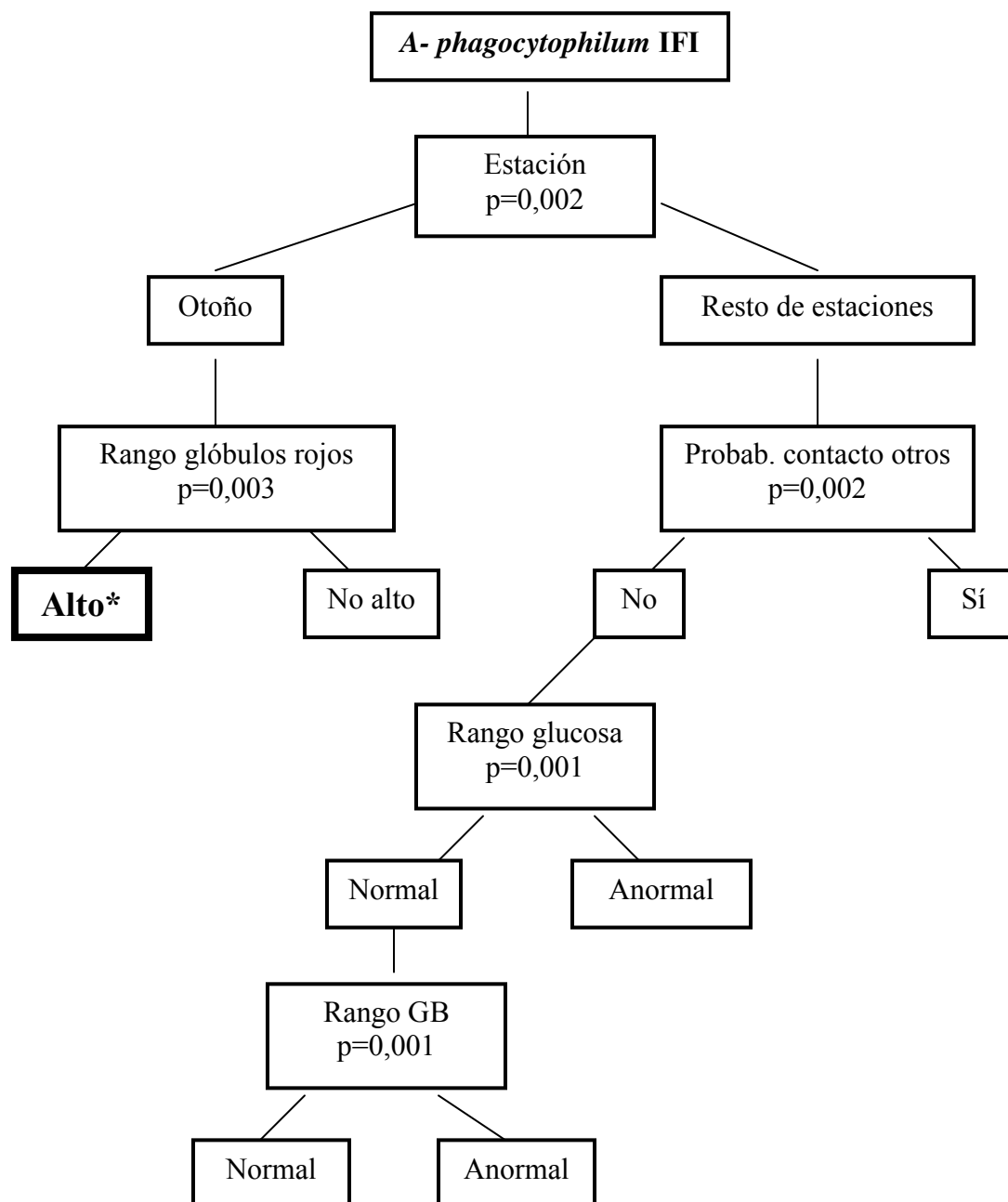
($p=0,369$), renales ($p=0,235$), neurológicos ($p=0,166$) o de otro tipo ($p=0,890$), ni con el hecho de ser sintomático o no ($p=0,235$).

5.2.2.5 Relación entre la seropositividad a *A. phagocytophilum* y el hemograma y análisis bioquímico sanguíneo

No se ha observado ningún tipo de asociaciones con los valores analíticos, ni cuando los valoramos de forma cualitativa en función del rango ni cuando los valoramos cuantitativamente. Así, observamos los siguientes valores de p : hematocrito ($p=0,702$ y $p=0,536$), hemoglobina ($p=0,686$ y $p=0,438$), glóbulos rojos ($p=0,061$ y $p=0,495$), VCM ($p=0,337$ y $p=0,345$), HCM ($p=0,088$ y $p=0,651$), CCMH ($p=0,247$ y $p=0,294$), leucocitos ($p=0,064$ y $p=0,411$), valor absoluto ($p=0,164$ y $p=0,558$) y relativo ($p=0,050$ y $p=0,355$) de neutrófilos, valor absoluto ($p=0,241$ y $p=0,700$) y relativo ($p=0,479$ y $p=0,921$) de linfocitos, valor absoluto ($p=0,219$ y $p=0,349$) y relativo ($p=0,876$ y $p=0,877$) de monocitos, valor absoluto ($p=0,232$ y $p=0,253$) y relativo ($p=0,167$ y $p=0,231$) de eosinófilos, el recuento de plaquetas ($p=0,568$ y $p=0,972$), el valor de proteínas totales ($p=0,557$ y $p=0,582$) y los valores de glucosa ($p=0,581$ y $p=0,385$), urea ($p=0,223$ y $p=0,227$), creatinina ($p=0,323$ y $p=0,853$), o ALT ($p=0,615$ y $p=0,609$).

5.2.2.6 Árboles de decisión

Al efectuarse el análisis estadístico realizando un árbol de decisión, se observaron los siguientes resultados:



* Porcentaje de seropositivos: 31%. *Odd's ratio*: 5,65.

El número de nodos obtenido fue de 11 (del 0 al 10), de nodos terminales 6 y de profundidad 4 niveles. Para el caso de *A. phagocytophilum*, el mayor porcentaje de animales seropositivos obtenido se observó entre los gatos controlados en otoño que, además, presentan un rango de glóbulos rojos alto (**31%**). El valor de *Odd's ratio* para este grupo alcanzó un valor de 5,65.

5.2.3 Seropositividad a *N. risticii*

Tan sólo un $1 \pm 0,4\%$ de la población resultó positiva serológicamente frente a *N. risticii*. Un 0,9% (n=6) tuvieron un título de 1:40 y un 0,1% (n=1) de 1:80 (Tabla 40).

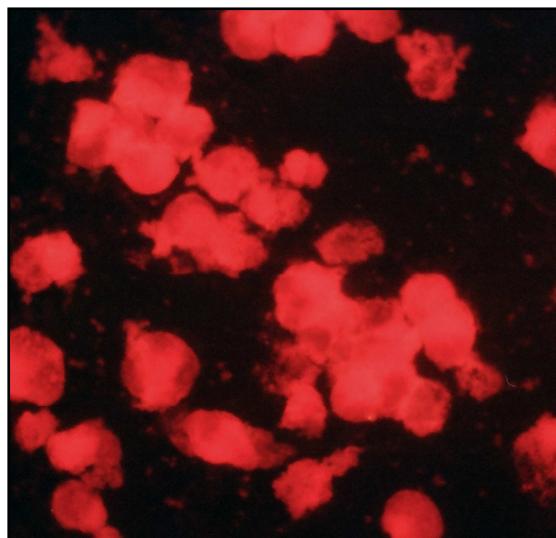
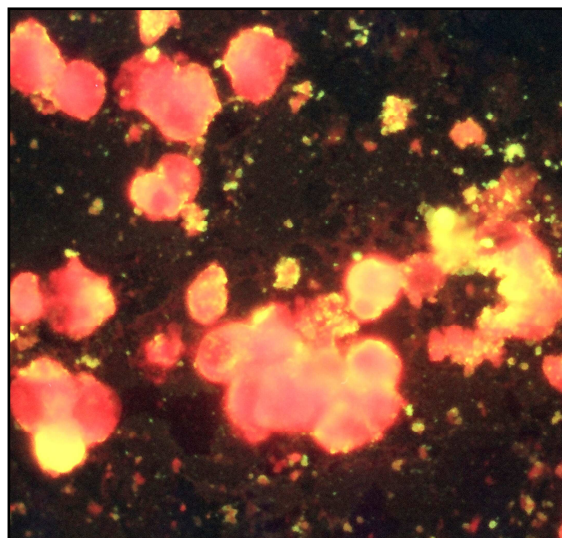
Tabla 40. Seroprevalencia frente a *N. risticii*

Titulo <i>N. risticii</i>	n	Porcentaje
Negativos	673	99%
1:40	6	0,9%
1:80	1	0,1%
Total	680	100%

Clasificándolo en las dos grandes subpoblaciones de este estudio, observamos un 0,7% (n=4) de gatos seropositivos a *N. risticii* entre los gatos procedentes de clínica, y un 2,1% (n=3) de seropositivos entre los gatos callejeros.

Las imágenes muestran reacción serológica positiva y negativa frente a este agente mediante IFI en nuestros gatos (Imagen 12).

Imagen 12. Imágenes positiva y negativa de IFI de *N. risticii* en gatos del estudio (40X)



5.2.3.1 Relación entre la seropositividad a *N. risticii* y la procedencia, raza, sexo, edad y castraciones

Tan sólo se observó asociación entre la seropositividad a *N. risticii* y el **sexo** del animal, observándose un mayor porcentaje de hembras entre los seropositivos a este agente ($p=0,013$) (Tabla 41).

Tabla 41. Relación entre la seropositividad a *N. risticii* y el sexo del animal

			<i>N. risticii</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
Sexo	Hembra	n	326	7	333
		Porcentaje	97,9%	2,1%	100,0%
		Residuos corregidos	-3,3	3,3	
	Macho	n	289	0	289
		Porcentaje	100,0%	,0%	100,0%
		Residuos corregidos	3,3	-3,3	
	Total	n	615	7	622
		Porcentaje	98,9%	1,1%	100,0%

($p=0,013$)

Con el resto de variables, no se encontró asociación entre la seropositividad a *N. risticii* y la procedencia ($p=0,147$), raza ($p=0,988$), edad, tanto al considerarla cualitativamente como cuantitativamente ($p=0,483$ y $p=0,198$), o castraciones ($p=0,608$).

5.2.3.2 Relación entre la seropositividad a *N. risticii* y diferentes datos del entorno

No se han encontrado asociaciones estadísticas con ninguna de las variables epidemiológicas analizadas, como son el mes y estación de recogida de muestras ($p=0,505$ y $p=0,367$), el área urbana, rural o periurbana donde vivían los animales ($p=0,193$), así como la zona de Madrid en la que habitaban ($p=0,364$), el tipo de vivienda ($p=0,300$), el hecho de salir al exterior de la vivienda ($p=0,631$), haber viajado fuera de Madrid ($p=0,168$), tener contacto con otros animales ($p=0,545$), la presencia de garrapatas ($p=0,409$), pulgas ($p=0,955$), roedores ($p=0,525$), pájaros ($p=0,608$) u otros ($p=0,207$), haber

recibido transfusiones de sangre ($p=0,804$), recibir tratamientos antiparasitarios externos ($p=0,693$) o con doxiciclina ($p=0,686$).

5.2.3.3 Relación entre la seropositividad a *N. risticii* y la presencia de enfermedades concurrentes

No se han observado asociaciones entre la seropositividad a este agente y el padecimiento de enfermedades concurrentes por FeLV, FIV o PIF ($p=0,533$, $p=0,601$ y $p=0,784$, respectivamente).

5.2.3.4 Relación entre la seropositividad a *N. risticii* y el cuadro clínico

Tampoco se han observado asociaciones entre la seropositividad a *N. risticii* con ningún tipo de manifestación clínica de tipo general ($p=0,061$), digestivo ($p=0,067$), cardiorrespiratorio ($p=0,225$), ocular ($p=0,712$), locomotor ($p=0,432$), renal ($p=0,608$), neurológico ($p=0,622$) o de otro tipo ($p=0,600$), ni con el hecho de ser sintomático o no serlo ($p=0,992$).

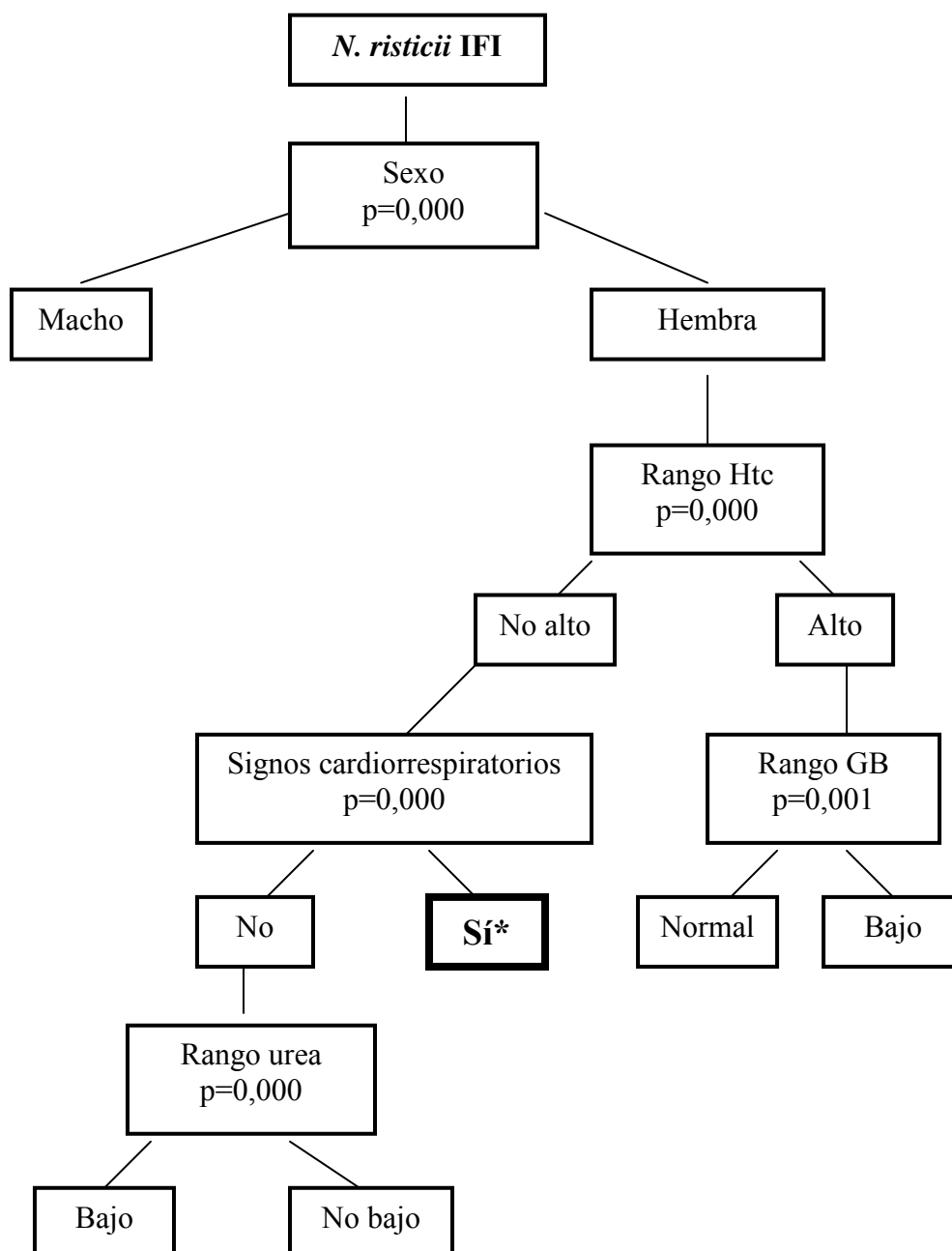
5.2.3.5 Relación entre la seropositividad a *N. risticii* y el hemograma y análisis bioquímico sanguíneo

No se han observado asociaciones entre la seropositividad a este agente y ningún valor analítico, cuando lo consideramos cualitativamente y cuantitativamente, observándose los siguientes valores de p para el hematocrito ($p=0,284$ y $p=0,309$), hemoglobina ($p=0,177$ y $p=0,395$), glóbulos rojos ($p=0,260$ y $p=0,157$), VCM ($p=0,946$ y $p=0,843$), HCM ($p=0,839$ y $p=0,419$), CCMH ($p=0,129$ y $p=0,493$), leucocitos ($p=0,173$ y $p=0,178$), valor absoluto ($p=0,430$ y $p=0,215$) y relativo ($p=0,388$ y $p=0,200$) de neutrófilos, valor absoluto ($p=0,919$ y $p=0,890$) y relativo ($p=0,564$ y $p=0,893$) de

linfocitos, valor absoluto ($p=0,607$ y $p=0,289$) y relativo ($p=0,451$ y $p=0,422$) de monocitos, valor absoluto ($p=0,664$ y $p=0,551$) y relativo ($p=0,622$ y $p=0,479$) de eosinófilos, el recuento de plaquetas ($p=0,826$ y $p=0,178$), el valor de proteínas totales ($p=0,391$ y $p=0,059$) y los valores de glucosa ($p=0,411$ y $p=0,750$), urea ($p=0,897$ y $p=0,733$), creatinina ($p=0,488$ y $p=0,609$), o ALT ($p=0,377$ y $p=0,352$).

5.2.3.6 Árboles de decisión

En este caso, al hacer el árbol de decisión, se observó lo siguiente:



* Porcentaje de seropositivos: 4,8%. *Odd's ratio*: 7,66

En este caso, se obtuvieron 11 nodos (del 0 al 10), siendo 6 los nodos terminales, y la profundidad fue de 4 niveles. Con este agente observamos que todos los animales seropositivos eran hembras. Las hembras con un valor de hematocrito normal o bajo con signos cardiorrespiratorios suponían un **4,8%**, que fue el valor más elevado de seropositividad para este agente. La *Odd's ratio* para este subgrupo fue de 7,66.

5.2.4 Seropositividad a *L. infantum*

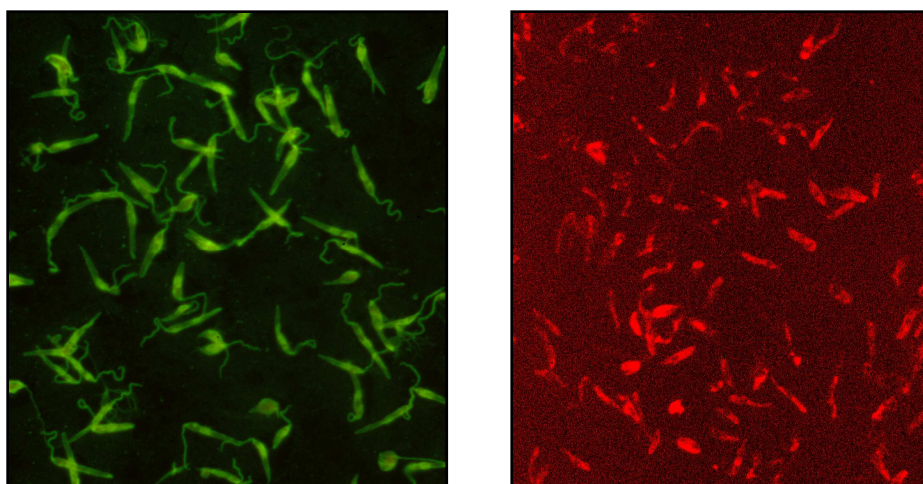
La seroprevalencia de *L. infantum* en los gatos estudiados fue del **3,7 ± 0,7%**. El 2,6% (n=18) con un título de 1:50, el 0,7% (n=5) con 1:100 y el 0,3% (n=2) con 1:400 (Tabla 42).

Tabla 42. Seroprevalencia frente a *L. infantum*

Titulo <i>L. infantum</i>	n	Porcentaje
Negativos	655	96,3%
1:50	18	2,6%
1:100	5	0,7%
1:400	2	0,3%
Total	680	100%

De entre los animales procedentes de la clínica, un 3% (n=16) eran seropositivos a *L. infantum*, mientras que de los callejeros, el porcentaje de seropositivos a este agente fue de 6,4% (n=9).

Las siguientes imágenes muestran reacción serológica positiva y negativa frente a este agente mediante IFI (Imagen 13).

Imagen 13. Imágenes de IFI positiva y negativa para *L. infantum* en gatos del estudio (40X)

5.2.4.1 Relación entre la seropositividad a *L. infantum* y la procedencia, raza, sexo, edad y castraciones

La procedencia, raza, sexo y castraciones del animal no parecían influir en la seropositividad a *L. infantum* ($p=0,055$, $p=0,999$, $p=0,369$ y $p=0,058$, respectivamente). Sin embargo, aunque las pruebas de chi cuadrado no fueron significativas ($p=0,125$), al considerar la **edad** como variable cuantitativa observamos una relación entre la misma y la seropositividad a *L. infantum*, de modo que la media de edad es mayor en los animales seropositivos a este agente ($p=0,032$) (Tabla 43).

Tabla 43. Relación entre la seropositividad a *L. infantum* y la edad como variable cuantitativa

Wilcoxon	<i>L. infantum</i> IFI	n	Rango promedio	Suma de rangos
Edad	negativo	561	287,75	161429,00
	positivo	19	371,63	7061,00
	Total	580		

(p=0,032)

5.2.4.2 Relación entre la seropositividad a *L. infantum* y diferentes datos del entorno

En este apartado no se han observado asociaciones estadísticas con el mes y estación de recogida de muestras ($p=0,093$ y $p=0,117$), el área urbana, rural o periurbana donde vivían los animales ($p=0,571$), así como la zona de Madrid en la que habitaban ($p=0,905$), el tipo de vivienda ($p=0,305$), salir al exterior de la vivienda ($p=0,059$), haber viajado fuera de Madrid ($p=0,877$), tener contacto con otros animales ($p=0,687$), la presencia de garrapatas ($p=0,822$), pulgas ($p=0,376$) o el contacto con roedores, pájaros u otros ($p=0,153$, $p=0,744$ y $p=0,773$, respectivamente). Tampoco se han encontrado asociaciones con el hecho de recibir transfusiones de sangre ($p=0,674$), el empleo de tratamientos antiparasitarios externos ($p=0,060$) o el haber sido tratados con doxiciclina ($p=0,494$).

5.2.4.3 Relación entre la seropositividad a *L. infantum* y la presencia de enfermedades concurrentes

Aunque no se observa asociación con la presencia de FeLV o PIF ($p=0,110$ y $p=0,580$), un mayor porcentaje de animales seropositivos padecían FIV ($p=0,024$) (Tabla 44).

Tabla 44. Relación entre la seropositividad a *L. infantum* y el padecimiento de FIV

			<i>L. infantum</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
FIV	No	n	465	15	480
		Porcentaje	96,9%	3,1%	100,0%
		Residuos corregidos	2,1	-2,1	
	Sí	n	23	3	26
		Porcentaje	88,5%	11,5%	100,0%
		Residuos corregidos	-2,1	2,1	
	Total	n	488	18	506
		Porcentaje	96,4%	3,6%	100,0%

($p=0,024$)

5.2.4.4 Relación entre la seropositividad a *L. infantum* y el cuadro clínico

En cuanto a la presentación de signos clínicos en el animal, se ha observado una asociación estadística entre la presencia de signos clínicos del tipo “**otros**” y la seropositividad a *L. infantum* ($p=0,006$) (Tabla 45).

Tabla 45. Relación entre la seropositividad a *L. infantum* y el padecimiento de otro tipo de signos clínicos

			<i>L. infantum</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
Otros signos	No	n	349	6	355
		Porcentaje	98,3%	1,7%	100,0%
		Residuos corregidos	5,8	-5,8	
	Sí	n	206	13	219
		Porcentaje	94,1%	5,9%	100,0%
		Residuos corregidos	-5,8	5,8	
	Total	n	555	19	574
		Porcentaje	96,7%	3,3%	100,0%
			$(p=0,006)$		

No se han observado asociaciones con la presencia de síntomas de tipo general ($p=0,882$), digestivo ($p=0,964$), cardiorrespiratorio ($p=0,052$), ocular ($p=0,107$), locomotor ($p=0,191$), renal ($p=0,210$) o neurológico ($p=0,412$). Tampoco se ha detectado asociación estadística entre la seropositividad a *L. infantum* y el hecho de ser sintomático o no serlo ($p=0,204$).

5.2.4.5 Relación entre la seropositividad a *L. infantum* y el hemograma y análisis bioquímico sanguíneo

Un mayor porcentaje de animales seropositivos a este agente poseían una **linfocitosis** relativa cuando se evaluó esta variable en función del rango ($p=0,041$) (Tabla 46). No obstante, no se observó tal asociación cuando valoramos los linfocitos de forma cuantitativa ($p=0,212$).

Tabla 46. Relación entre la seropositividad a *L. infantum* y el valor de linfocitos como variable cualitativa

			<i>L. infantum</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
Rango linfocitos %	Alto	n	36	4	40
		Porcentaje	90,0%	10,0%	100,0%
		Residuos corregidos	-2,7	2,7	
	Bajo	n	159	5	164
		Porcentaje	97%	3%	100,0%
		Residuos corregidos	,4	-,4	
	Normal	n	278	7	285
		Porcentaje	97,5%	2,5%	100,0%
		Residuos corregidos	2,3	-2,3	
	Total	n	473	16	489
		Porcentaje	96,7%	3,3%	100,0%

(p=0,041)

La chi cuadrado también mostró una asociación entre la seropositividad a *L. infantum* y un rango de ALT elevado (p=0,008) (Tabla 47).

Tabla 47. Relación entre la seropositividad a *L. infantum* y el rango de la ALT como variable cualitativa

			<i>L. infantum</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
Rango ALT	Alto	n	72	7	79
		Porcentaje	91,1%	8,9%	100,0%
		Residuos corregidos	-4,1	4,1	
	Bajo	n	7	1	8
		Porcentaje	87,5%	12,5%	100,0%
		Residuos corregidos	-,7	,7	
	Normal	n	370	9	379
		Porcentaje	97,6%	2,4%	100,0%
		Residuos corregidos	4,8	-4,8	
	Total	n	449	17	466
		Porcentaje	96,4%	3,6%	100,0%

(p=0,008)

Sin embargo, al analizar la ALT como variable cuantitativa, no se han encontrado diferencias entre grupos (p=0,250).

En cuanto a las demás variables analíticas, no se han encontrado asociaciones en ninguna de las pruebas estadísticas en que se valoran de forma cualitativa y cuantitativa estas variables. Así, observamos los siguientes valores de p: hematocrito (p=0,615 y p=0,551), hemoglobina (p=0,133 y p=0,950), glóbulos rojos (p=0,391 y p=0,321), VCM

($p=0,167$ y $p=0,052$), HCM ($p=0,649$ y $p=0,192$), CCMH ($p=0,124$ y $p=0,277$), leucocitos ($p=0,754$ y $p=0,796$), valor absoluto ($p=0,843$ y $p=0,329$) y relativo ($p=0,304$ y $0,349$) de neutrófilos, valor absoluto ($p=0,774$ y $p=0,609$) de linfocitos, valor absoluto ($p=0,539$ y $p=0,260$) y relativo ($p=0,348$ y $p=0,700$) de monocitos, valor absoluto ($p=0,537$ y $p=0,262$) y relativo ($p=0,383$ y $p=0,277$) de eosinófilos, el recuento de plaquetas ($p=0,391$ y $p=0,127$), las proteínas totales ($p=0,485$ y $p=0,208$) y los valores de glucosa ($p=0,773$ y $p=0,396$), urea ($p=0,070$ y $p=0,183$) o creatinina ($p=0,448$ y $p=0,456$).

5.2.4.6 Árboles de decisión

El árbol de decisión no seleccionó la inclusión de ninguna de las variables independientes analizadas.

5.2.5 Seropositividad a *B. henselae*

En la población total de animales, un $23,8 \pm 1,6\%$ presentó reacción serológica positiva frente a *B. henselae*. Un 19,7% ($n=134$) de los animales presentó un título de 1:64, un 2,8% ($n=19$) de 1:128, un 1% ($n=7$) de 1:256, un 0,1% ($n=1$) de 1:512 y un 0,1% ($n=1$) de 1:1024 (Tabla 48).

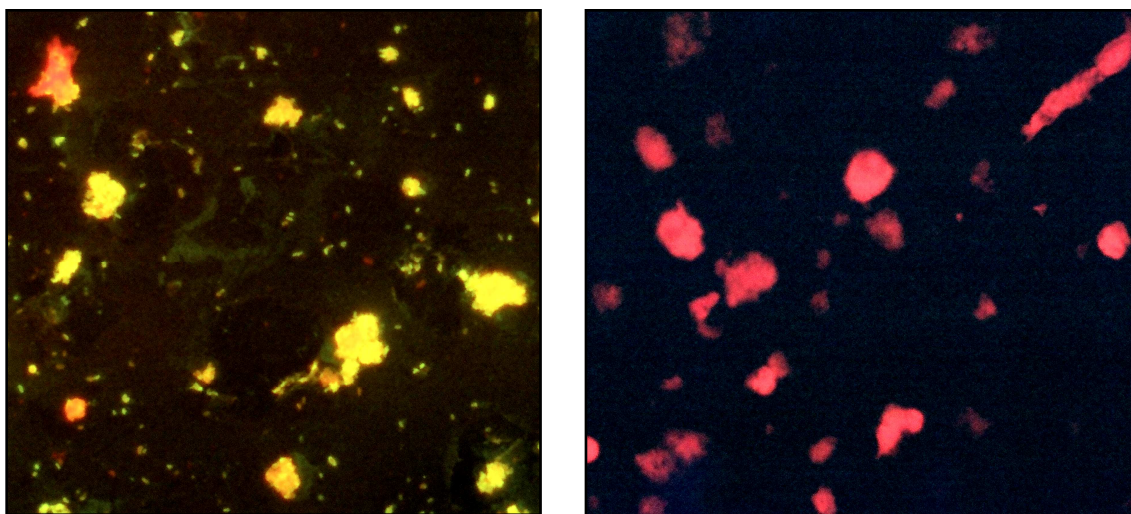
Tabla 48. Seroprevalencia frente a *B. henselae*

Título <i>B. henselae</i>	n	Porcentaje
Negativos	518	76,2%
1:64	134	19,7%
1:128	19	2,8%
1:256	7	1%
1:512	1	0,1%
1:1024	1	0,1%
Total	680	100%

Dividiéndolos en subpoblaciones según la procedencia, observamos, un 23,7% (n=128) de animales procedentes de clínica seropositivos a *B. henselae*, mientras que el porcentaje fue del 24,1% (n=34) para los gatos callejeros.

Las siguientes imágenes muestran reacción serológica positiva y negativa mediante IFI a este agente empleando muestras de gato (Imagen 14).

Imagen 14. Imágenes de IFI positiva y negativa para *B. henselae* en gatos de nuestro estudio (40X)



5.2.5.1 Relación entre la seropositividad a *B. henselae* y la procedencia, raza, sexo, edad y castraciones

Un mayor porcentaje de animales seropositivos a *B. henselae* estaban **castrados** (p=0,044) (Tabla 49).

Tabla 49. Relación entre la seropositividad a *B. henselae* y el hecho de estar castrado o no

			<i>B. henselae</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
¿Castrado?	No	n	204	48	252
		Porcentaje	81,0%	19,0%	100,0%
		Residuos corregidos	10,1	-10,1	
	Sí	n	240	85	325
		Porcentaje	73,8%	26,2%	100,0%
		Residuos corregidos	-10,1	10,1	
	Total	n	444	133	577
		Porcentaje	76,9%	23,1%	100,0%

(p=0,044)

(p=0,044)

Además, al analizar la **edad** como variable cuantitativa, observamos una asociación entre la seropositividad a este agente y una mayor edad del animal ($p=0,017$) (Tabla 50), aunque no encontramos tal asociación cuando consideramos esta variable como cualitativa ($p=0,063$).

Tabla 50. Relación entre la seropositividad a *B. henselae* y la edad como variable cuantitativa

Wilcoxon	<i>B. henselae</i> IFI	n	Rango promedio	Suma de rangos
Edad	negativo	445	281,39	125218,00
	positivo	135	320,53	43272,00
	Total	580		

($p=0,017$)

Con el resto de variables (procedencia, raza y sexo), no se observaron diferencias significativas ($p=0,928$, $p=0,655$ y $p=0,497$, respectivamente).

5.2.5.2 Relación entre la seropositividad a *B. henselae* y diferentes datos del entorno

El contacto con **pulgas** estaba asociado estadísticamente con la seropositividad a *B. henselae* ($p=0,011$) (Tabla 51).

Tabla 51. Relación entre la seropositividad a *B. henselae* y el contacto con pulgas

			<i>B. henselae</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
Contacto pulgas	No	n	287	85	372
		Porcentaje	77,2%	22,8%	100,0%
		Residuos corregidos	8,4	-8,4	
	Sí	n	44	26	70
		Porcentaje	62,9%	37,1%	100,0%
		Residuos corregidos	-8,4	8,4	
	Total	n	331	111	442
		Porcentaje	74,9%	25,1%	100,0%

($p=0,011$)

También se ha visto un mayor porcentaje de seropositivos entre los gatos que han realizado **viajes** a algún lugar de España o fuera de España ($p=0,046$) (Tabla 52).

Tabla 52. Relación entre la seropositividad a *B. henselae* y el haber realizado viajes fuera de la Comunidad de Madrid

			<i>B. henselae</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
Viajes	No	n	192	53	245
		Porcentaje	78,4%	21,6%	100,0%
		Residuos corregidos	8,4	-8,4	
	Sí	n	107	47	154
		Porcentaje	69,5%	30,5%	100,0%
		Residuos corregidos	-8,4	8,4	
Total	n	299	100	399	
	Porcentaje	74,9%	25,1%	100,0%	

(p=0,046)

($p=0,046$)

No se han observado asociaciones con el mes y estación de recogida de muestras ($p=0,940$ y $p=0,815$), el área urbana, rural o periurbana donde vivían los animales ($p=0,565$), así como la zona de Madrid en la que habitan ($p=0,473$), el tipo de vivienda ($p=0,204$), las salidas al exterior de la vivienda ($p=0,423$) o el contacto con otros animales ($p=0,131$). Tampoco se han encontrado asociaciones con respecto a la presencia de garrapatas, el contacto con roedores, pájaros u otros ($p=0,058$, $p=0,232$, $p=0,252$ y $p=0,286$, respectivamente), la administración de transfusiones de sangre ($p=0,447$), el empleo de tratamientos antiparasitarios externos ($p=0,526$) o la administración de tratamientos con doxiciclina ($p=0,641$).

5.2.5.3 Relación entre la seropositividad a *B. henselae* y la presencia de enfermedades concurrentes

No se han observado influencias significativas del padecimiento de enfermedades concurrentes (FeLV, FIV o PIF) en la seropositividad a *B. henselae* ($p=0,070$, $p=0,180$ y $p=0,174$, respectivamente).

5.2.5.4 Relación entre la seropositividad a *B. henselae* y el cuadro clínico

Existió asociación estadística entre la seropositividad a este agente y el padecimiento de signos clínicos de tipo “**otros**” ($p=0,040$) (Tabla 53).

Tabla 53. Relación entre la seropositividad a *B. henselae* y el padecimiento de otro tipo de signos clínicos

			<i>B. henselae</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
Otros signos	No	n	284	71	355
		Porcentaje	80,0%	20,0%	100,0%
		Residuos corregidos	10,0	-10,0	
	Sí	n	159	60	219
		Porcentaje	72,6%	27,4%	100,0%
		Residuos corregidos	-10,0	10,0	
	Total	n	443	131	574
		Porcentaje	77,2%	22,8%	100,0%

($p=0,040$)

Con el resto de síntomas clínicos no se observó una asociación estadística, encontrándonos valores de p mayores de 0,05 al evaluar la presentación de signos generales ($p=0,452$), digestivos ($p=0,287$), cardiorrespiratorios ($p=0,510$), oculares ($p=0,561$), locomotores ($p=0,582$), renales ($p=0,253$) o neurológicos ($p=0,852$). Tampoco se ha encontrado asociación estadística con el hecho de ser sintomático o no serlo ($p=0,214$).

5.2.5.5 Relación entre la seropositividad a *B. henselae* y el hemograma y análisis bioquímico sanguíneo

Los animales seropositivos presentaban en mayor porcentaje **leucopenia** y un recuento de leucocitos **normal**, como demuestran las pruebas de chi cuadrado ($p=0,028$) (Tabla 54).

Tabla 54. Relación entre la seropositividad a *B. henselae* y el rango de leucocitos como variable cualitativa

			<i>B. henselae</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
Rango GB	Alto	n	81	12	93
		Porcentaje	87,0%	13,0%	100,0%
		Residuos corregidos	9,6	-9,6	
	Bajo	n	48	19	67
		Porcentaje	71,6%	28,4%	100,0%
		Residuos corregidos	-3,3	3,3	
	Normal	n	245	84	329
		Porcentaje	74,5%	25,5%	100,0%
		Residuos corregidos	-6,5	6,5	
	Total	n	374	115	489
		Porcentaje	76,5%	23,5%	100,0%

(p=0,028)

Al analizar el recuento leucocitario como una variable cuantitativa, el rango promedio era menor en los gatos seropositivos frente a este agente (p=0,023) (Tabla 55).

Tabla 55. Relación entre la seropositividad a *B. henselae* y el valor leucocitario como variable cuantitativa

Wilcoxon	<i>B. henselae</i> IFI	n	Rango promedio	Suma de rangos
GB	negativo	374	251,01	93126,50
	positivo	115	216,92	24728,50
	Total	489		

(p=0,023)

Dentro de esta leucopenia, las pruebas de chi cuadrado mostraron que un mayor porcentaje de animales seropositivos presentaban el recuento absoluto y relativo de **neutrófilos** segmentados normal, respectivamente (p=0,041 y p=0,034) (Tabla 56, Tabla 57). Sin embargo, al considerar estas variables como cuantitativas, aunque próximo en algún caso, no se observó ninguna asociación estadística en el recuento absoluto y relativo de neutrófilos (p=0,057 y p=0,128).

Tabla 56. Relación entre la seropositividad a *B. henselae* y el recuento absoluto de neutrófilos segmentados como variable cualitativa

			<i>B. henselae</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
Rango neutrófilos segmentados	Alto	n	61	7	68
		Porcentaje	89,7%	10,3%	100,0%
		Residuos corregidos	7,9	-7,9	
	Bajo	n	32	12	44
		Porcentaje	72,7%	27,3%	100,0%
		Residuos corregidos	-1,2	1,2	
	Normal	n	281	96	377
		Porcentaje	74,6%	25,4%	100,0%
		Residuos corregidos	-6,7	6,7	
	Total	n	374	115	489
		Porcentaje	76,5%	23,5%	100,0%

(p=0,041)

Tabla 57. Relación entre la seropositividad a *B. henselae* y el recuento relativo de neutrófilos segmentados como variable cualitativa

			<i>B. henselae</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
Rango neutrófilos segmentados %	Alto	n	122	24	146
		Porcentaje	83,6%	16,4%	100,0%
		Residuos corregidos	10,6	-10,6	
	Bajo	n	23	6	29
		Porcentaje	79,3%	20,7%	100,0%
		Residuos corregidos	,6	-,6	
	Normal	n	229	85	314
		Porcentaje	73,0%	27,0%	100,0%
		Residuos corregidos	-11,3	11,3	
	Total	n	374	115	489
		Porcentaje	76,5%	23,5%	100,0%

(p=0,034)

Se ha observado asociación entre la seropositividad a este agente y el hecho de presentar un rango de **proteínas totales** alto (p=0,026), tal y como también se confirmó al valorar las proteínas totales como variable cuantitativa (p=0,003) (Tabla 58, Tabla 59).

Tabla 58. Relación entre la seropositividad a *B. henselae* y el rango de proteínas totales como variable cualitativa

			<i>B. henselae</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
Rango proteínas totales	Alto	n	105	48	153
		Porcentaje	68,6%	31,4%	100,0%
		Residuos corregidos	-10,2	10,2	
	Bajo	n	35	5	40
		Porcentaje	87,5%	12,5%	100,0%
		Residuos corregidos	4,2	-4,2	
	Normal	n	213	60	273
		Porcentaje	78,0%	22,0%	100,0%
		Residuos corregidos	6,0	-6,0	
	Total	n	353	113	466
		Porcentaje	75,8%	24,2%	100,0%

(p=0,026)

Tabla 59. Relación entre la seropositividad a *B. henselae* y el valor de proteínas totales como variable cuantitativa

T-Student	<i>B. henselae</i> IFI	n	Media	Desv. típica
PT	negativo	353	7,06	1,018
	positivo	113	7,40	,988
	Total	466		

(p=0,003)

La **glucosa**, como variable cuantitativa, se presentaba en valores más bajos en los animales seropositivos a *B. henselae* (p=0,014), aunque no se observó dicha asociación cuando consideramos esta variable como cualitativa (p=0,534) (Tabla 60).

Tabla 60. Relación entre la seropositividad a *B. henselae* y el valor de glucosa como variable cuantitativa

Wilcoxon	<i>B. henselae</i> IFI	n	Rango promedio	Suma de rangos
Glucosa	negativo	309	209,28	64668,00
	positivo	93	175,65	16335,00
	Total	402		

(p=0,014)

El valor de **creatinina** también se asoció con la seropositividad a *B. henselae* cuando se consideraba como variable cuantitativa, observándose un valor más elevado de creatinina en los animales seropositivos ($p=0,007$), aunque no se observó tal asociación analizándola, mediante el test de la chi cuadrado, como variable cualitativa ($p=0,640$) (Tabla 61).

Tabla 61. Relación entre la seropositividad a *B. henselae* y el valor de creatinina como variable cuantitativa

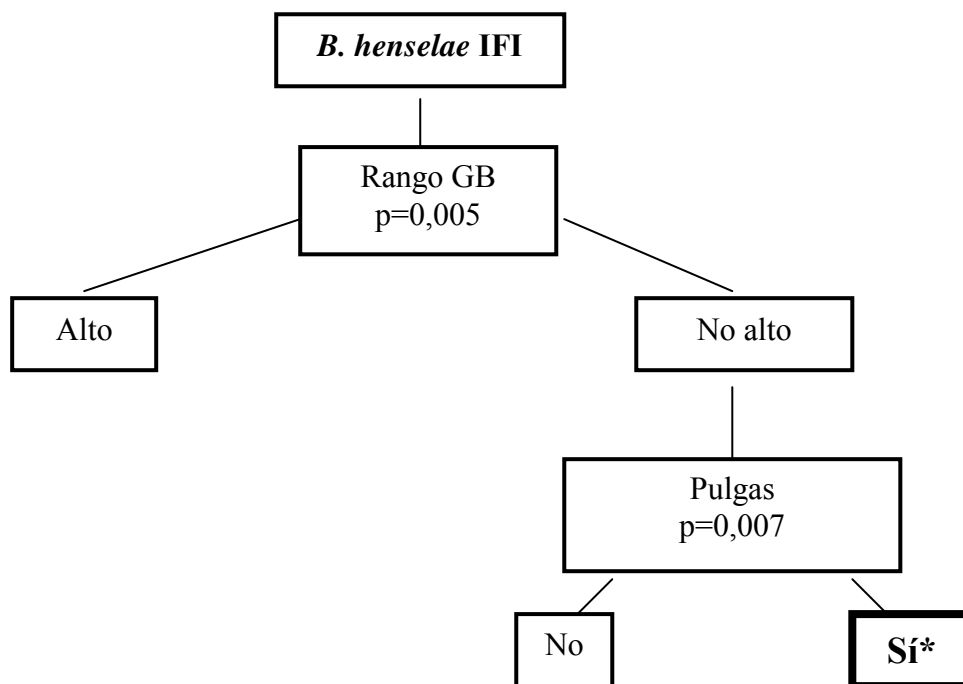
Wilcoxon	<i>B. henselae</i> IFI	n	Rango promedio	Suma de rangos
Creatinina	negativo	353	224,46	80804,00
	positivo	113	264,22	28007,00
	Total	466		

($p=0,007$)

No se han observado asociaciones, ni en las valoraciones cualitativas ni en las cuantitativas, con el valor del hematocrito ($p=0,387$ y $p=0,933$), hemoglobina ($p=0,053$ y $p=0,783$), glóbulos rojos ($p=0,809$ y $p=0,772$), VCM ($p=0,317$ y $p=0,686$), HCM ($p=0,294$ y $p=0,960$), CCMH ($p=0,185$ y $p=0,629$), valor absoluto ($p=0,918$ y $p=0,809$) y relativo ($p=0,090$ y $p=0,218$) de linfocitos, valor absoluto ($p=0,202$ y $p=0,174$) y relativo ($p=0,931$ y $p=0,660$) de monocitos, valor absoluto ($p=0,064$ y $p=0,300$) y relativo ($p=0,489$ y $p=0,601$) de eosinófilos, el recuento de plaquetas ($p=0,256$ y $p=0,194$) y los valores de urea ($p=0,115$ y $p=0,674$) y ALT ($p=0,624$ y $p=0,717$).

5.2.5.6 Árboles de decisión

Al realizar el estudio en árboles de decisión, observamos lo siguiente:



* Porcentaje de seropositivos: 41,7%. *Odd's ratio*: 2,44.

En este caso observamos tan solo 5 nodos (del 0 al 4), siendo 3 los nodos terminales, y la profundidad de 2 niveles. Cuando consideramos los animales seropositivos que tienen leucopenia o valor de leucocitos normal y que presentan contacto con pulgas, observamos que el porcentaje aumentaba notablemente (**41,7%**). El valor de *Odd's ratio* en este caso fue de 2,44.

5.2.6 Seropositividad a más de un agente simultáneamente

Con los resultados serológicos obtenidos, hemos observado la presencia de concurrencias por varios de los cinco agentes analizados en el estudio.

El total de animales seropositivos a más de un agente resultó ser de $9,9 \pm 1,1\%$. A continuación mostramos la distribución de nuestra población en función de la seropositividad a todos los agentes estudiados, de forma global:

	n	Porcentaje
Negativos	441	64,9%
Seropositivos a uno exclusivamente	172	25,3%
Seropositivos a dos exclusivamente	55	8%
Seropositivos a tres exclusivamente	12	1,8%
Total	680	100%

En las siguientes tablas desglosamos la relación de animales seropositivos frente a uno (Tabla 62), dos (Tabla 63) y tres agentes (Tabla 64).

Tabla 62. Número de animales seropositivos frente a un agente exclusivamente

Seropositivos 1 agente	n	Porcentaje del total (n=680)
<i>E. canis</i>	20	2,9%
<i>A. phagocytophilum</i>	30	4,4%
<i>N. risticii</i>	2	0,3%
<i>L. infantum</i>	11	1,6%
<i>B. henselae</i>	109	16%
Total seropositivos 1 agente	172	25,3%

Un total de 55 gatos (8%) presentaban anticuerpos frente a dos agentes simultáneamente.

Tabla 63. Número de animales seropositivos a dos agentes simultáneamente

	<i>E. canis</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>N. risticii</i>	<i>L. infantum</i>	<i>B. henselae</i>
<i>E. canis</i>	X	5	1	5	25
<i>A. phagocytop.</i>	5	X	0	2	11
<i>N. risticii</i>	1	0	X	1	0
<i>L. infantum</i>	5	2	1	X	5
<i>B. henselae</i>	25	11	0	5	X
Total seropositivos a 2 agentes	n=55 (8%)				

Observamos que un 1,8% (n=12) de los gatos incluidos en el estudio presentaban anticuerpos frente a tres agentes simultáneamente.

Tabla 64. Número de animales seropositivos frente a más de dos agentes simultáneamente

<i>E. canis</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>B. henselae</i>	n=8
	<i>N. risticii</i>	<i>B. henselae</i>	n=3
<i>A. phagocytophilum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>B. henselae</i>	n=1
Total seropositivos a 3 agentes			n=12 (1,8%)

El análisis estadístico en busca de asociaciones entre la seropositividad a los cinco agentes incluidos en el estudio mostró una asociación entre la seropositividad a *E. canis* y *A. phagocytophilum* (p=0,001), *E. canis* y *N. risticii* (p=0,000), *E. canis* y *B. henselae* (p=0,000) y *A. phagocytophilum* y *B. henselae* (p=0,037) (Tabla 65, Tabla 66, Tabla 67, Tabla 68).

Tabla 65. Relación entre la seropositividad a *E. canis* y a *A. phagocytophilum*

			<i>A. phagocytophilum</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
<i>E. canis</i> IFI	Negativo	n	569	44	613
		Porcentaje	92,8%	7,2%	100,0%
		Residuos corregidos	7,4	-7,4	
	Positivo	n	54	13	67
		Porcentaje	80,6%	19,4%	100,0%
		Residuos corregidos	-7,4	7,4	
	Total	n	623	57	680
		Porcentaje	91,6%	8,4%	100,0%

(p=0,001)

Tabla 66. Relación entre la seropositividad a *E. canis* y a *N. risticii*

			<i>N. risticii</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
<i>E. canis</i> IFI	Negativo	n	610	3	613
		Porcentaje	99,5%	,5%	100,0%
		Residuos corregidos	3,3	-3,3	
	Positivo	n	63	4	67
		Porcentaje	94,0%	6,0%	100,0%
		Residuos corregidos	-3,3	3,3	
	Total	n	673	7	680
		Porcentaje	99,0%	1,0%	100,0%

(p=0,000)

Tabla 67. Relación entre la seropositividad a *E. canis* y a *B. henselae*

			<i>B. henselae</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
<i>E. canis</i> IFI	Negativo	n	487	126	613
		Porcentaje	79,4%	20,6%	100,0%
		Residuos corregidos	20,0	-20,0	
	Positivo	n	31	36	67
		Porcentaje	46,3%	53,7%	100,0%
		Residuos corregidos	-20,0	20,0	
	Total	n	518	162	680
		Porcentaje	76,2%	23,8%	100,0%

(p=0,000)

Tabla 68. Relación entre la seropositividad a *A. phagocytophilum* y a *B. henselae*

			<i>B. henselae</i> IFI		
			Negativo	Positivo	Total
<i>A. phagocytophilum</i> IFI	Negativo	n	481	142	623
		Porcentaje	77,2%	22,8%	100,0%
		Residuos corregidos	6,4	-6,4	
	Positivo	n	37	20	57
		Porcentaje	64,9%	35,1%	100,0%
		Residuos corregidos	-6,4	6,4	
	Total	n	518	162	680
		Porcentaje	76,2%	23,8%	100,0%

(p=0,037)

No se encontró ninguna asociación entre la seropositividad a *E. canis* y *L. infantum* ($p=0,083$), *A. phagocytophilum* y *N. risticii* ($p=0,421$), *A. phagocytophilum* y *L. infantum* ($p=0,506$), *N. risticii* y *L. infantum* ($p=0,134$), *N. risticii* y *B. henselae* ($p=0,235$) ni *L. infantum* y *B. henselae* ($p=0,990$).

5.2.6.1 Relación entre la seropositividad a más de uno de los agentes estudiados y la procedencia, raza, sexo, edad y castraciones

Tanto como variable cualitativa como cuantitativa, se observó una influencia de la **edad** en dicha seropositividad ($p=0,015$ y $p=0,000$) (Tabla 69, Tabla 70). Así, observamos que un mayor porcentaje de animales seropositivos a más de un agente eran geriátricos, y la media de edad fue mayor en los seropositivos a más de un agente.

Tabla 69. Relación entre la seropositividad a más de un agente y la edad como variable cualitativa

			IFI seropositiva a más de uno		
			No	Sí	Total
Rango edad	Adulto	n	299	33	332
		Porcentaje	90,1%	9,9%	100,0%
		Residuos corregidos	,8	-,8	
	Cachorro	n	108	5	113
		Porcentaje	95,6%	4,4%	100,0%
		Residuos corregidos	6,5	-6,5	
	Geriátricos	n	114	21	135
		Porcentaje	84,4%	15,6%	100,0%
		Residuos corregidos	-7,3	7,3	
	Total	n	521	59	580
		Porcentaje	89,8%	10,2%	100,0%

($p=0,015$)

Tabla 70. Relación entre la seropositividad a más de un agente y la edad como variable cuantitativa

Wilcoxon	Seropositivo a más de uno	n	Rango promedio	Suma de rangos
Edad	No	521	280,76	1496276,00
	Sí	59	376,51	22214,00
	Total	580		

($p=0,000$)

Además, se encontró una asociación con la **raza** del animal, observándose que un mayor porcentaje de seropositivos a más de un agente eran de otras razas distintas al Común Europeo ($p=0,035$) (Tabla 71).

Tabla 71. Relación entre la seropositividad a más de un agente y la raza

			IFI seropositiva a más de uno		
			No	Sí	Total
Raza	C. Europeo	n	424	39	463
		Porcentaje	91,6%	8,4%	100,0%
		Residuos corregidos	6,8	-6,8	
	Otras razas	n	132	22	154
		Porcentaje	85,9%	14,1%	100,0%
		Residuos corregidos	-6,8	6,8	
	Total	n	556	61	617
		Porcentaje	90,1%	9,9%	100,0%

($p=0,035$)

No se observó ningún tipo de asociación con la procedencia, sexo o castración del animal ($p=0,217$, $p=0,392$ y $p=0,077$).

5.2.6.2 Relación entre la seropositividad a más de uno de los agentes estudiados y diferentes datos del entorno

Se ha observado una asociación entre la seropositividad a más de un agente simultáneamente y la presencia de **garrapatas** ($p=0,049$) (Tabla 72).

Tabla 72. Relación entre la seropositividad a más de un agente y el contacto con garrapatas

			IFI seropositiva a más de uno		
			No	Sí	Total
Contacto garrapatas	No	n	358	48	406
		Porcentaje	88,2%	11,8%	100,0%
		Residuos corregidos	3,7	-3,7	
	Sí	n	26	8	34
		Porcentaje	76,5%	23,5%	100,0%
		Residuos corregidos	-3,7	3,7	
	Total	n	384	56	440
		Porcentaje	87,3%	12,7%	100,0%

($p=0,049$)

No se han observado asociaciones con el mes y estación de recogida de muestras ($p=0,176$ y $p=0,562$), el área urbana, rural o periurbana donde vivían los animales ($p=0,099$), así como la zona de Madrid en la que habitaban ($p=0,374$), el tipo de vivienda ($p=0,378$), las salidas al exterior de la vivienda ($p=0,239$), el hecho de viajar fuera de Madrid ($p=0,250$) o el contacto con otros animales ($p=0,698$). Tampoco se ha encontrado asociación con la presencia de pulgas, el contacto con roedores, pájaros u otros ($p=0,220$, $p=0,368$ y $p=0,570$ y $p=0,302$ respectivamente), el hecho de recibir transfusiones de sangre ($p=0,384$), recibir tratamientos antiparasitarios externos ($p=0,217$) o haber sido tratados con doxiciclina ($p=0,162$).

5.2.6.3 Relación entre la seropositividad a más de uno de los agentes estudiados y la presencia de enfermedades concurrentes

No se han observado influencias significativas del padecimiento de cada una de las enfermedades concurrentes estudiadas (FeLV, FIV y PIF) en la seropositividad a más de un agente ($p=0,137$, $p=0,701$ y $p=0,194$), si bien, se ha detectado que existe una asociación estadísticamente significativa entre la seropositividad a más de un agente del estudio y la ausencia de **enfermedades concurrentes**, cuando las consideramos un solo factor ($p=0,038$) (Tabla 73).

Tabla 73. Relación entre la seropositividad a más de un agente y la presencia de enfermedades concurrentes

Enf. concurrente			IFI seropositiva a más de uno		
			No	Sí	Total
	No	n	392	48	440
		Porcentaje	89,1%	10,9%	100,0%
		Residuos corregidos	-4,8	4,8	
	Sí	n	67	2	69
		Porcentaje	97,1%	2,9%	100,0%
		Residuos corregidos	4,8	-4,8	
	Total	n	459	50	509
		Porcentaje	90,2%	9,8%	100,0%

($p=0,038$)

5.2.6.4 Relación entre la seropositividad a más de uno de los agentes estudiados y el cuadro clínico

Se ha observado una asociación con el padecimiento de signos clínicos de tipo “**otros**” y la seropositividad a más de un agente ($p=0,011$) (Tabla 74).

Tabla 74. Relación entre la seropositividad a más de un agente y el padecimiento de otro tipo de signos clínicos

			IFI seropositiva a más de uno		
			No	Sí	Total
Otros signos	No	n	327	28	355
		Porcentaje	92,1%	7,9%	100,0%
		Residuos corregidos	9,1	-9,1	
	Sí	n	187	32	219
		Porcentaje	85,4%	14,6%	100,0%
		Residuos corregidos	-9,1	9,1	
	Total	n	514	60	574
		Porcentaje	89,7%	10,3%	100,0%

($p=0,011$)

Con el resto de síntomas clínicos, como son los signos generales ($p=0,259$), digestivos ($p=0,946$), cardiorrespiratorios ($p=0,353$), oculares ($p=0,630$), locomotores ($p=0,923$), renales ($p=0,651$) o neurológicos ($p=0,452$) y con el hecho de ser sintomático o no serlo ($p=0,498$), no se ha observado una asociación estadísticamente significativa.

5.2.6.5 Relación entre la seropositividad a más de uno de los agentes estudiados y el hemograma y análisis bioquímico sanguíneo

Se ha observado asociación estadística entre la seropositividad a alguno de los agentes estudiados y el rango de **hematocrito** alto en la prueba de la chi cuadrado ($p=0,033$), aunque al considerar esta variable como cuantitativa no observamos tal asociación ($p=0,238$) (Tabla 75).

Tabla 75. Relación entre la seropositividad a más de un agente y el rango de hematocrito como variable cualitativa

			IFI seropositiva a más de uno		
			No	Sí	Total
Rango hematocrito	Alto	n	23	7	30
		Porcentaje	76,7%	23,3%	100,0%
		Residuos corregidos	-3,9	3,9	
	Bajo	n	83	6	89
		Porcentaje	93,3%	6,7%	100,0%
		Residuos corregidos	3,1	-3,1	
	Normal	n	333	37	370
		Porcentaje	90,0%	10,0%	100,0%
		Residuos corregidos	,8	-,8	
	Total	n	439	50	489
		Porcentaje	89,8%	10,2%	100,0%

(p=0,033)

Las proteínas totales, analizadas tanto como variable cualitativa como cuantitativa, también se asocian a la seropositividad a más de uno de estos agentes, ya que los animales seropositivos con mayor probabilidad poseían **hiperproteïnemia** (p=0,033 y 0,007) (Tabla 76, Tabla 77).

Tabla 76. Relación entre la seropositividad a más de un agente y el rango de proteínas totales como variable cualitativa

			IFI seropositiva a más de uno		
			No	Sí	Total
Rango proteínas totales	Alto	n	130	23	153
		Porcentaje	85,0%	15,0%	100,0%
		Residuos corregidos	-7,6	7,6	
	Bajo	n	38	2	40
		Porcentaje	95,0%	5,0%	100,0%
		Residuos corregidos	1,8	-1,8	
	Normal	n	253	20	273
		Porcentaje	92,7%	7,3%	100,0%
		Residuos corregidos	5,7	-5,7	
	Total	n	421	45	466
		Porcentaje	90,3%	9,7%	100,0%

(p=0,033)

Tabla 77. Relación entre la seropositividad a más de un agente y el valor de proteínas totales como variable cuantitativa

Wilcoxon	Seropositivo a más de uno	n	Rango promedio	Suma de rangos
PT	No	421	213,09	83531,50
	Sí	45	266,69	11734,50
	Total	466		

(p=0,007)

Se ha observado, como variable cuantitativa, una asociación con un valor de **creatinina** elevada ($p=0,020$) (Tabla 78), aunque el valor de p no fue significativo cuando consideramos la creatinina como variable cualitativa ($p=0,222$).

Tabla 78. Relación entre la seropositividad a más de un agente y el valor de creatinina como variable cualitativa

Wilcoxon	Seropositivo a más de uno	n	Rango promedio	Suma de rangos
Creatinina	No	421	228,78	96316,50
	Sí	45	277,66	12494,50
	Total	466		

($p=0,020$)

No se han observado asociaciones entre la seropositividad a más de un agente y el valor de hemoglobina ($p=0,164$ y $p=0,284$), glóbulos rojos ($p=0,169$ y $p=0,238$), VCM ($p=0,641$ y $p=0,494$), HCM ($p=0,588$ y $p=0,767$), CCMH ($p=0,303$ y $p=0,321$), rango de leucocitos ($p=0,262$ y $p=0,757$), recuento absoluto ($p=0,549$ y $p=0,860$) y relativo ($p=0,548$ y $p=0,733$) de los neutrófilos segmentados, valor absoluto ($p=0,529$ y $p=0,870$) y relativo ($p=0,466$ y $p=0,395$) de linfocitos, valor absoluto ($p=0,249$ y $p=0,452$) y relativo ($p=0,248$ y $p=0,267$) de monocitos, valor absoluto ($p=0,177$ y $p=0,517$) y relativo ($p=0,081$ y $p=0,409$) de eosinófilos, recuento de plaquetas ($p=0,338$ y $p=0,224$) y los valores de glucosa ($p=0,533$ y $p=0,553$), urea ($p=0,362$ y $p=0,609$) y ALT ($p=0,600$ y $p=0,951$).

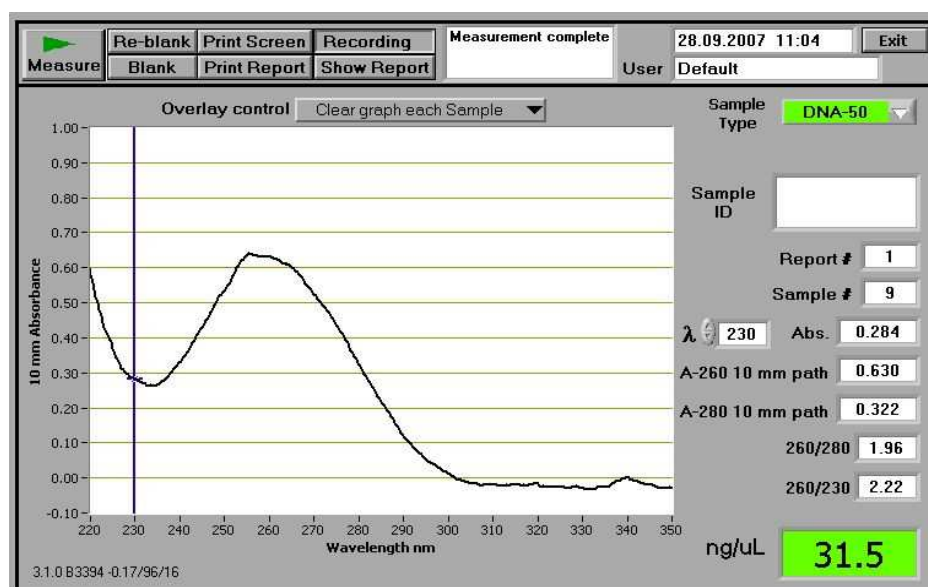
5.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

En cuanto a las técnicas moleculares, a continuación describimos los resultados obtenidos empleando la técnica de PCR en los gatos del estudio, así como los resultados de sensibilidad y especificidad de la misma.

5.3.1 Cuantificación del ADN

En la cuantificación del ADN de cada muestra mediante espectrofotometría (Nanodrop®), el 70% de las muestras presentaban una concentración óptima de ADN (entre 10 y 40 ng/μl), mientras que en aquellos casos en los que la concentración fue superior (5,2%) o inferior (24,8%) al rango óptimo, se realizaron ajustes en la preparación de la premezcla para la PCR, de manera que se optimizaba esa concentración de ADN. Además, en todos los casos, la relación ADN/proteínas fue normal, no observándose inhibidores que nos pudieran influir en los resultados de la PCR (Imagen 15).

Imagen 15. Imagen de cuantificación de la concentración de ADN mediante Nanodrop® y la medición de la relación ADN/proteínas en una de nuestras muestras analizadas



5.3.2 Sensibilidad de la PCR

La PCR de *Ehrlichia*/*Anaplasma*/*Neorickettsia* spp. empleando diluciones seriadas de los controles positivos de *E. canis*, *A. phagocytophilum* y *N. risticii*, nos mostró que la mínima cantidad de células infectadas por microlitro que se podían detectar mediante dicha técnica de PCR era variable dependiendo de la especie.

Para el caso de *E. canis*, se contaron 812 células infectadas en 20 µl, lo que correspondía a 203 células infectadas en 5 µl, que es lo que se cargaba en el gel de electroforesis para hacer la PCR. Al hacer las diluciones seriadas, se amplificó banda hasta la dilución 1/300, con lo que la sensibilidad sería de 0,67 células infectadas en los 5 µl de muestra, o lo que es lo mismo, 0,13 células infectadas en 1 µl. Por tanto, la mínima cantidad de células infectadas por *E. canis* que podía detectar la PCR de *Ehrlichia/Anaplasma/Neorickettsia* 16S ARNr fue de, aproximadamente, **0,13 células infectadas/µl**.

Para *A. phagocytophilum*, se contaron 1204 células infectadas en 20 µl, lo que suponía 301 células infectadas en los 5 µl de muestra añadida. El límite de detección en este caso estaba en 1/20 de la dilución madre, por lo que correspondería a 15 células infectadas en 5 µl, o lo que es lo mismo, 3 células infectadas en 1 µl. Por tanto, la cantidad mínima de células infectadas que detectaba la PCR de *Ehrlichia/Anaplasma/Neorickettsia* 16S ARNr fue de, aproximadamente, **3 células infectadas/µl** para el caso de *A. phagocytophilum*.

Para *N. risticii*, se contaron 580 células infectadas en 20 µl, con lo que en 5 µl (volumen de la muestra) se incluyen 145 células. El límite de detección de la PCR fue de 1/20 de la dilución madre, lo que correspondía a 7,25 células en 5 µl o, lo que es lo mismo, 1,45 células en 1 µl. Por tanto, la cantidad mínima de células infectadas que detectaba la PCR de *Ehrlichia/Anaplasma/Neorickettsia* 16S ARNr fue de, aproximadamente, **1,45 células infectadas/µl** para el caso de *N. risticii*.

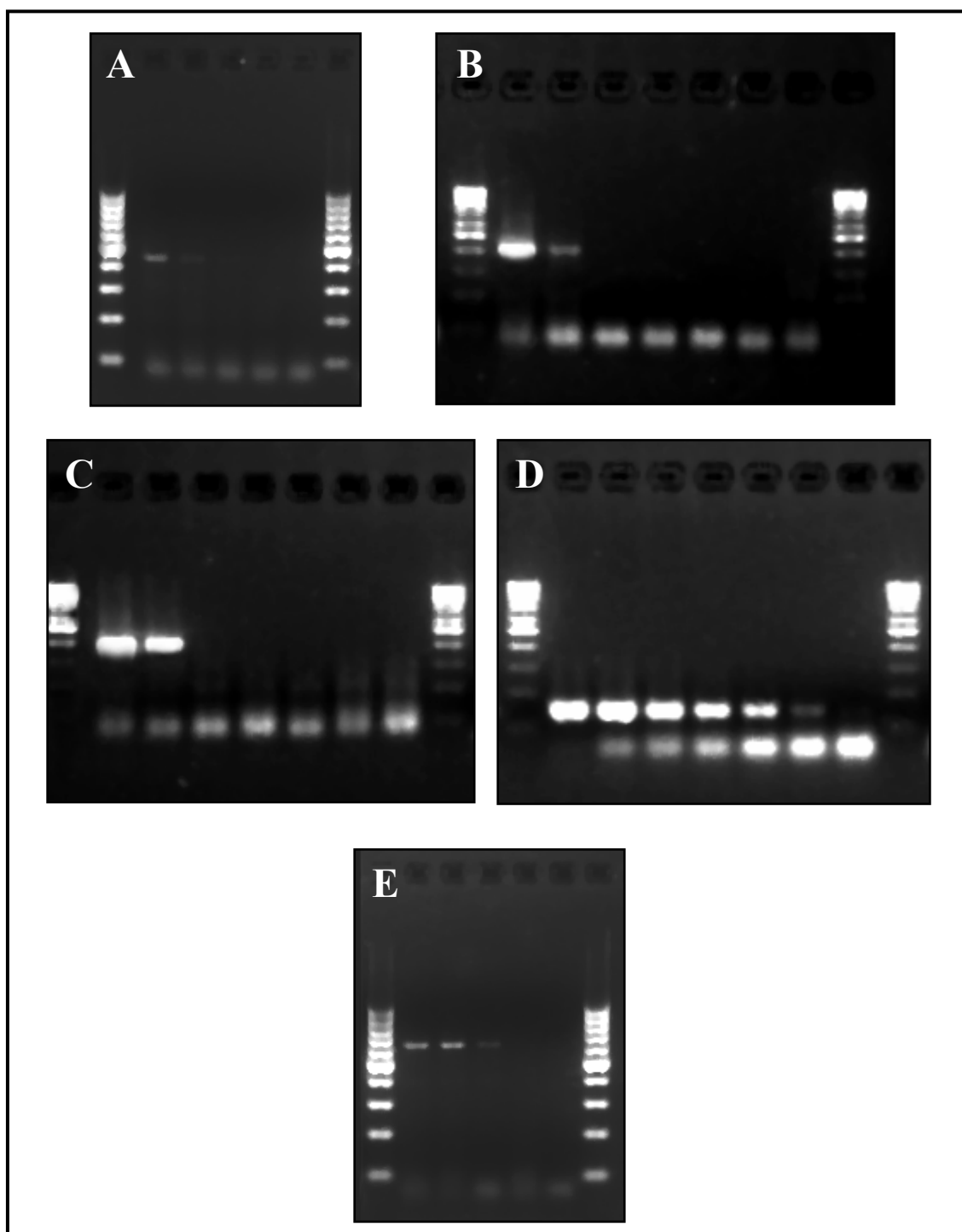
En cuanto a la PCR de *L. infantum*, en este caso el cálculo es a partir de promastigotes por µl, si bien hay que tener en cuenta que *Leishmania* spp. se encuentra en el hospedador vertebrado en forma de amastigote, con lo que, de nuevo, este cálculo es únicamente orientativo. Así, la cantidad de promastigotes de *L. infantum* por 20 µl fue de 5×10^4 . El límite de detección fue de $1/4 \times 10^5$. Por tanto, la cantidad mínima de *L. infantum* que detectaba la PCR de *Leishmania* spp. kDNA fue de, aproximadamente, **$6,25 \times 10^{-3}$ promastigotes/µl**.

Para el caso de *B. henselae*, se contaron 778 células infectadas en 20 µl, lo que correspondía a 194,5 células infectadas en los 5 µl del volumen de muestra. En este caso el

límite de detección de la PCR fue de 1/400, lo que supone 0,48 células infectadas en 5 μ l, o lo que es lo mismo, 0,097 células en 1 μ l. Por tanto, la cantidad mínima de células infectadas por *B. henselae* que detectaba la PCR de *Bartonella* spp. ITS fue de, aproximadamente, **0,097 células/ μ l**.

A continuación mostramos unas imágenes donde se muestra el límite de detección de las distintas especies incluidas en el estudio. Se realizaron, como hemos comentado, dos PCRs con las diluciones, una de ellas de 1/100 y, a partir de la última amplificación, se hicieron de 1/10 para ajustar más el límite de detección. En estas imágenes mostramos sólo una de las PCRs realizadas con las diluciones (Imagen 16).

Imagen 16. Imágenes de geles de electroforesis donde se muestran algunos límites de detección de la técnica de PCR. La banda derecha e izquierda de cada imagen son los marcadores de 100 pares de bases. A: Límite de detección de la PCR de *Ehrlichia/Anaplasma/Neorickettsia* empleando *E. canis* como control positivo. B: Límite de detección de la PCR de *Ehrlichia/Anaplasma/Neorickettsia* empleando *A. phagocytophilum* como control positivo. C: Límite de detección de la PCR de *Ehrlichia/Anaplasma/Neorickettsia* empleando *N. risticii* como control positivo. D: Límite de detección de la PCR de *Leishmania spp. kDNA* empleando *L. infantum* como control positivo. E: Límite de detección de la PCR de *Bartonella spp.* empleando *B. henselae* como control positivo



5.3.3 Especificidad y límite de detección de la PCR

Al realizarse los protocolos de PCR descritos en el apartado de materiales y métodos de la presente tesis, se observó que cada una de las PCR's realizadas amplificaba el agente objeto de amplificación por los cebadores específicos y no se observó amplificación de ninguno de los otros controles incluidos en cada PCR. Se debe tener en cuenta que la PCR de *Ehrlichia/Anaplasma/Neorickettsia* spp. amplifica los controles positivos de *E. canis*, *A. phagocytophilum* y *N. risticii*, y que en el caso en el que se obtuvo alguna amplificación, se procedió a la purificación y envío a secuenciación, o a la realización de una PCR específica de especie.

A continuación mostramos unas imágenes de especificidad de cada reacción de PCR. En todos los casos se cargaron en el gel los siguientes controles, por orden de izquierda a derecha: *E. canis*, *A. phagocytophilum*, *N. risticii*, *L. infantum*, *B. henselae*, y ADN de los cultivos celulares libres de patógenos DH82, HL60, P388D1 y Vero. En la Imagen 17 observamos la especificidad de la reacción de PCR de *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Neorickettsia* 16S ARNr a nivel de género. En la Imagen 18 observamos la especificidad de la PCR de *Leishmania* spp. del ADN del kinetoplasto (kDNA). En la Imagen 19 observamos la especificidad de la reacción de PCR de *Bartonella* spp. ITS.

Imagen 17. Especificidad de la reacción de la PCR de *Ehrlichia/Anaplasma/Neorickettsia* 16S ARNr género. A: Amplificación del ADN de *Ehrlichia* spp. B: Amplificación del ADN de *Anaplasma* spp. C: Amplificación del ADN de *Neorickettsia* spp. Se comprueba que en los restantes pocillos (*Leishmania* spp., *Bartonella* spp. y el ADN de DH82, HL60 y P388D1 y Vero) no se observa amplificación alguna

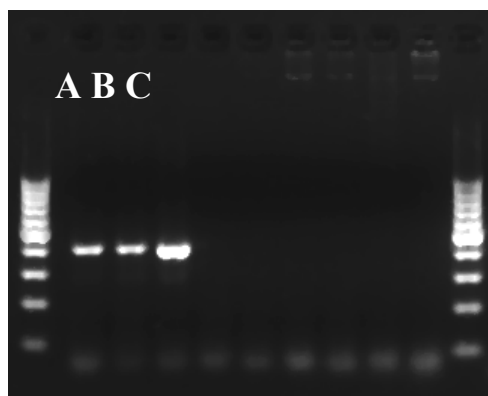


Imagen 18. Especificidad de la reacción de la PCR de *Leishmania* spp. kDNA. D: Amplificación del ADN de *Leishmania* spp. Se comprueba que en los restantes pocillos (*Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia*, *B. henselae*, y el ADN de DH82, HL60 y P388D1 y Vero) no se observa amplificación alguna

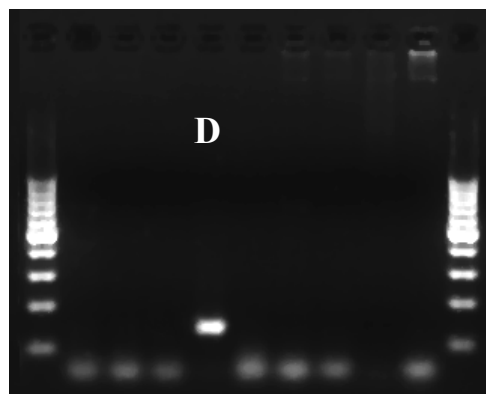
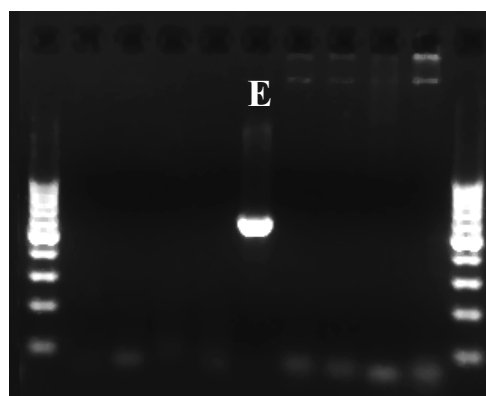


Imagen 19. Especificidad de la reacción de PCR de *Bartonella* spp. ITS. E: Amplificación del ADN de *Bartonella* spp. Se comprueba que en los restantes pocillos (*Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia*, *Leishmania* spp. y el ADN de DH82, HL60 y P388D1 y Vero) no se observa amplificación alguna

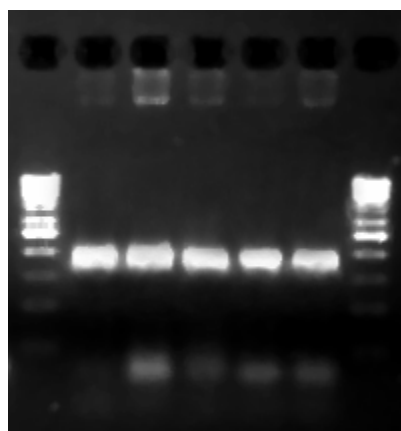


5.3.4 Resultados obtenidos mediante PCR

5.3.4.1 *Housekeeping*

En todos los casos obtuvimos una amplificación favorable en el *housekeeping*, con lo que en todas nuestras muestras existía ADN potencialmente amplificable y sin presencia de inhibidores de la PCR (Imagen 20).

Imagen 20. Ejemplo de *housekeeping* en cinco de las muestras procesadas. Observamos bandas de amplificación en las cinco muestras incluidas. A los lados derecho e izquierdo observamos los marcadores de 100 pares de bases



5.3.4.2 PCR de *Ehrlichia*/*Anaplasma*/*Neorickettsia* spp.

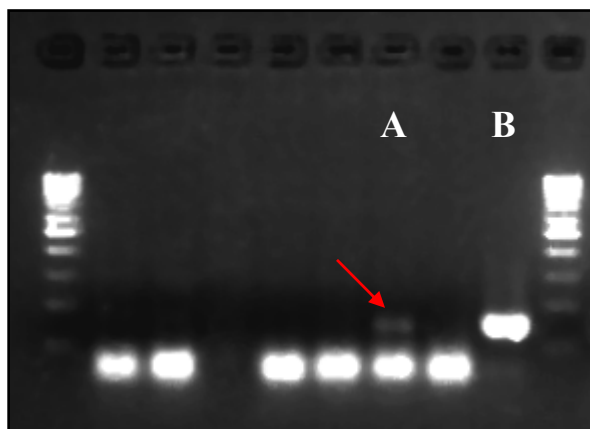
No se obtuvo amplificación de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. o *Neorickettsia* spp. empleando la técnica de PCR en ninguno de los gatos incluidos en el estudio.

En un 6,2% de los gatos analizados mediante PCR se detectó alguna banda no específica. En esos casos se llevó a cabo una PCR específica de especie y la secuenciación de la banda, estudios que no arrojaron ningún resultado concluyente.

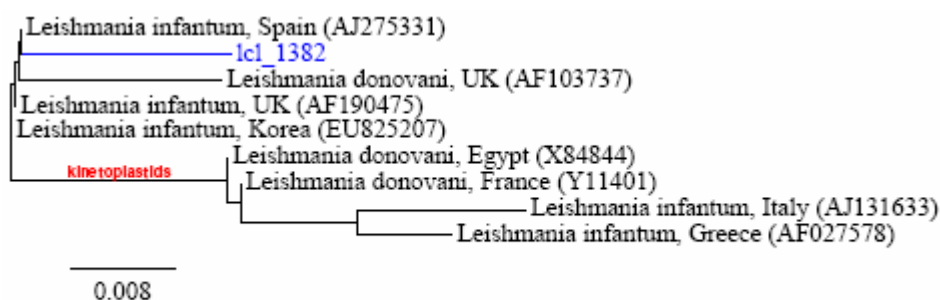
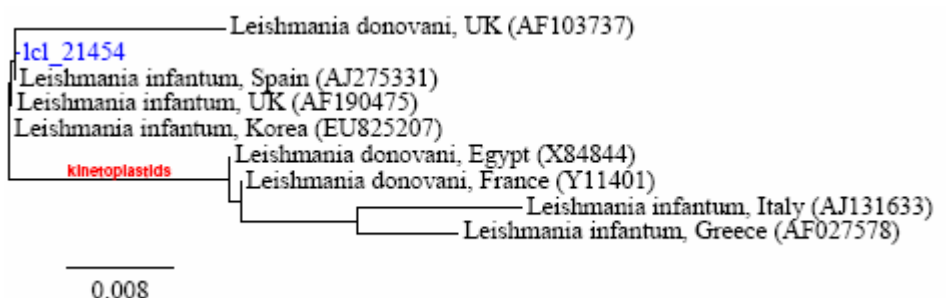
5.3.4.3 PCR de *Leishmania* spp.

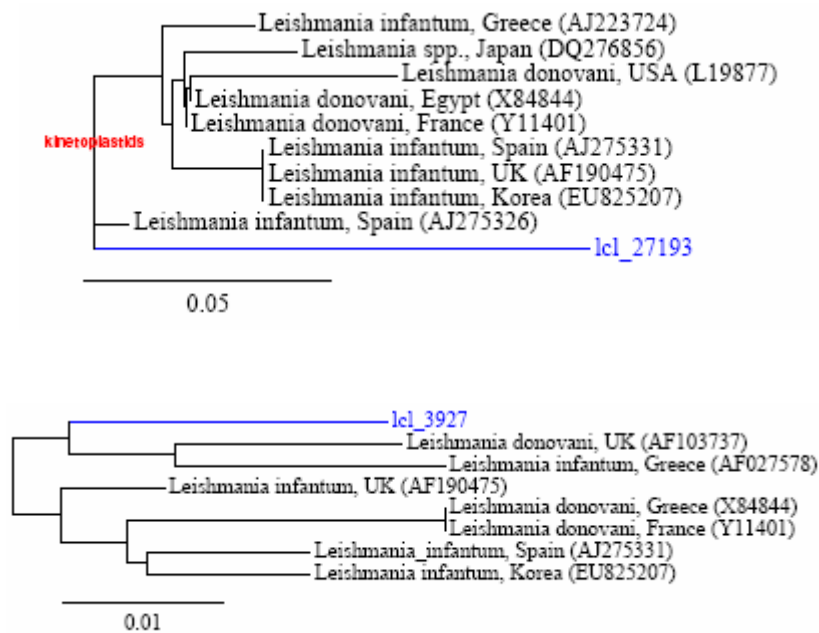
Para el caso de *Leishmania* spp., se obtuvo amplificación en un total de 4 animales (Imagen 21). En estos casos se procedió a la secuenciación de la banda, obteniéndose los siguientes resultados: tres de las secuencias presentaron elevados grados de similitud (95%, 96% y 90%) con “*L. infantum* kinetoplast partial minicircle DNA”, España (AJ275331 y AJ275326). En uno de los casos, la mayor similitud (95%) se presentó con las especies “*L. infantum* minicircle DNA”, Grecia (AF027578) y “*L. donovani* kinetoplast minicircle DNA”, Reino Unido (AF103737).

Imagen 21. Amplificación de ADN de *Leishmania* spp. en una de las muestras analizadas. A: muestra positiva. B: control positivo de *Leishmania* spp.



A continuación mostramos, representados como árboles filogenéticos, la distancia filogenética de las cuatro secuencias obtenidas en este estudio con distintas secuencias de *Leishmania* spp. depositadas previamente en GenBank. Las secuencias amplificadas en nuestro laboratorio vienen representadas en azul, con los nombres lcl-21454, lcl-1382, lcl-27193 y lcl-3927.





De estos animales en los que se obtuvo amplificación de *Leishmania* spp., tres procedían de clínica y uno de la calle.

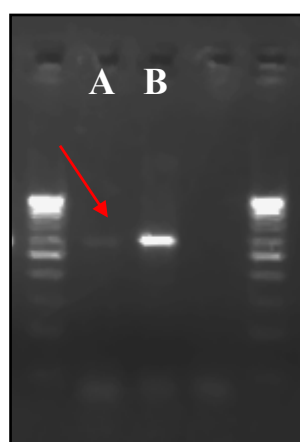
De los tres gatos procedentes de clínica, uno de ellos era Común Europeo y los dos restantes eran de otras razas (Siamés y Angora Turco); todos eran machos, adultos y estaban castrados. Vivían en piso. No presentaban historia de contacto con garrapatas, pulgas, ni de contacto con pájaros, roedores u otros. Ninguno de ellos recibía tratamientos antiparasitarios externos ni tenían enfermedades concurrentes (FeLV, FIV o PIF). Tan sólo uno de ellos presentaba queratitis eosinofílica, con la aparición de legañas, opacidad corneal, conjuntivitis, nistagmo bilateral y disnea. Este gato resultó además ser seropositivo frente a *E. canis* y a *B. henselae* conjuntamente. Los otros dos animales eran asintomáticos, si bien uno de ellos presentaba un valor de creatinina elevado. Todos ellos fueron seronegativos a *L. infantum*.

El gato procedente de la calle era un macho, Común europeo, no castrado, que vivía en la calle y tenía contacto con otros gatos. Presentaba pulgas y era positivo a FIV. En el momento de la toma de muestra de sangre para su análisis se observó que el gato estaba caquéctico, tenía las mucosas pálidas y presentaba rinotraqueitis, con secreción ocular. Este gato era seropositivo a *L. infantum* con un título de 1:100.

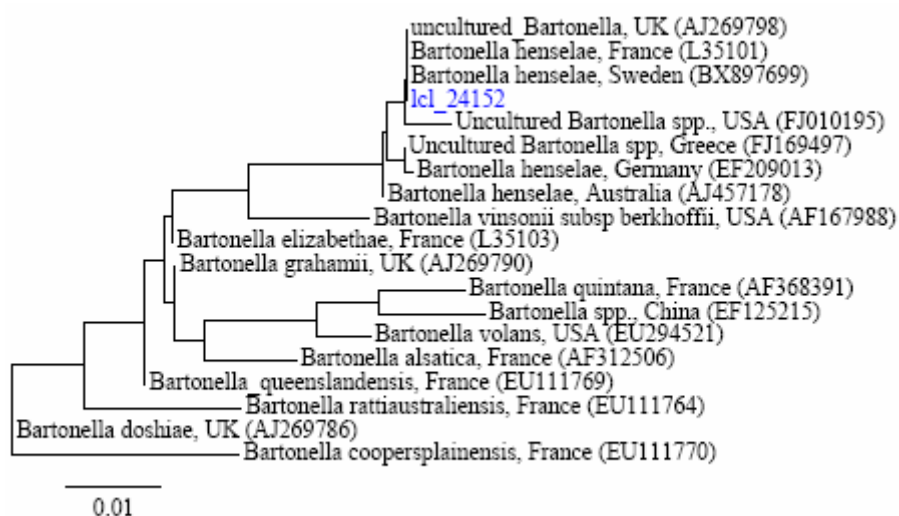
5.3.4.4 PCR de *Bartonella* spp.

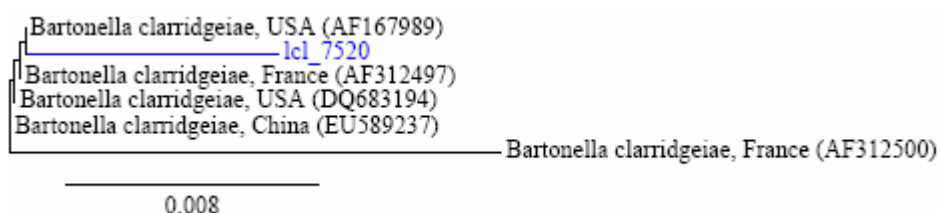
En 2 gatos se obtuvo en la PCR amplificación de *Bartonella* spp. (Imagen 22). La posterior secuenciación mostró un 100% de similitud en un caso con “*B. henselae* strain *Houston-1*”, Suecia (BX897699); en el otro se mostró un 99% de similitud con “*B. clarridgeiae*”, Estados Unidos (AF167989).

Imagen 22. Amplificación de ADN de *Bartonella* spp. en una de las muestras analizadas. A: muestra de gato positiva. B: control positivo de *Bartonella* spp.



A continuación representamos imágenes de las distancias filogenéticas de las secuencias obtenidas en nuestro estudio con distintas especies de *Bartonella* previamente depositadas en GenBank, mediante árboles filogenéticos. Las especies amplificadas en nuestro laboratorio vienen representadas en color azul, y se denominan lcl-24152 y lcl-7520.





Uno de estos animales procedía de la clínica y el otro era callejero. El procedente de la clínica era un macho, adulto, que vivía en piso y no salía al exterior, tenía contacto con otra gata, y presentaba pulgas. No se desparasitaba externamente ni había salido nunca de Madrid. El gato presentaba anorexia, depresión, pérdida de peso, rinitis, secreción ocular y debilidad del tercio posterior. La analítica era normal. Este animal era seropositivo a *B. henselae* con un título de 1:64.

Del gato procedente de la calle, sus antecedentes eran desconocidos y era un animal negativo a los virus de la leucemia e inmunodeficiencia felinas, pero seropositivo a *B. henselae* con un título de 1:64.

5.3.5 Asociaciones estadísticas con los resultados moleculares

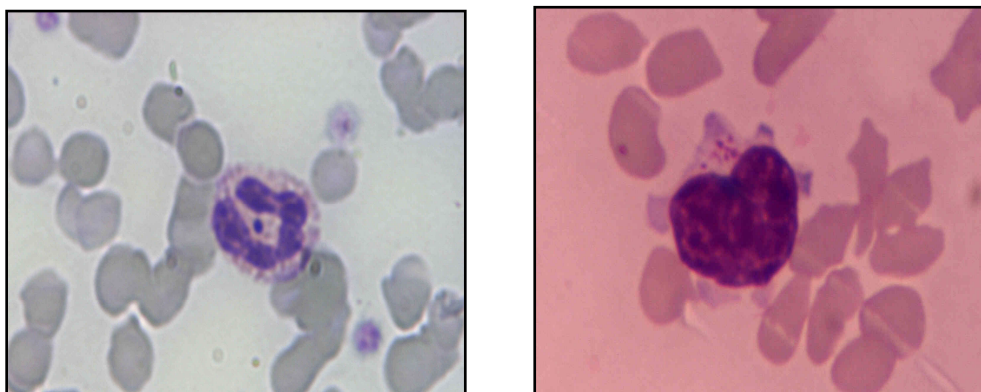
Dado el bajo número de animales positivos utilizando técnicas moleculares, no se ha realizado el estudio estadístico entre los resultados obtenidos con estas técnicas y todas las variables analizadas.

5.4 FROTIS SANGUÍNEOS

En la observación microscópica de frotis sanguíneos realizados en la mayoría de los gatos, no se observó la presencia de inclusiones intracelulares en ningún frotis, salvo en

cuatro casos (1%) que se catalogaron como dudosos, en los que se observaron inclusiones intracitoplasmáticas especialmente en linfocitos y en un caso en células granulocíticas (Imagen 23). Tres de estos casos fueron seropositivos a *A. phagocytophilum*.

Imagen 23. A: Imagen de inclusión intracitoplasmática en un eosinófilo. B: Imagen de inclusiones intracitoplasmáticas en un linfocito activado



5.5 CULTIVOS CELULARES

Como hemos señalado con anterioridad, se procedió al cultivo de cada sangre obtenida en condiciones de esterilidad en distintas líneas celulares (DH82, HL60 y P388D1) para observar el posible crecimiento de *E. canis*, *A. phagocytophilum*, *N. risticii* o *L. infantum*, y con ello demostrar la presencia de estos organismos en sangre. Además, se realizó una PCR a partir de cada cultivo celular para descartar la posibilidad de un crecimiento de estos agentes que pudiera haber pasado desapercibido en su lectura al microscopio.

Aunque en todos los casos los resultados de todos los protocolos de PCR a partir de cultivo fueron negativos, observamos varios casos muy sospechosos de infección por agentes ehrlichiales en algunos de los cultivos.

Así, en la línea celular DH82 observamos inclusiones intracitoplasmáticas en dos casos, aproximadamente tras 4 semanas post-inoculación, en la línea celular HL60 observamos inclusiones en otros dos casos, a los 15 días post-inoculación y en la línea

P388D1 no observamos ningún tipo de crecimiento en forma de inclusiones (Imagen 24, Imagen 25, Imagen 26, Imagen 27, Imagen 28, Imagen 29). El porcentaje de infección fue bajo, y disminuyó progresivamente hasta dejar de observarse las imágenes compatibles con infección por estas especies.

Imagen 24. Imágenes al microscopio óptico de la línea celular DH82 teñidas mediante May-Grünwald-Giemsa sin infección visible (40X)

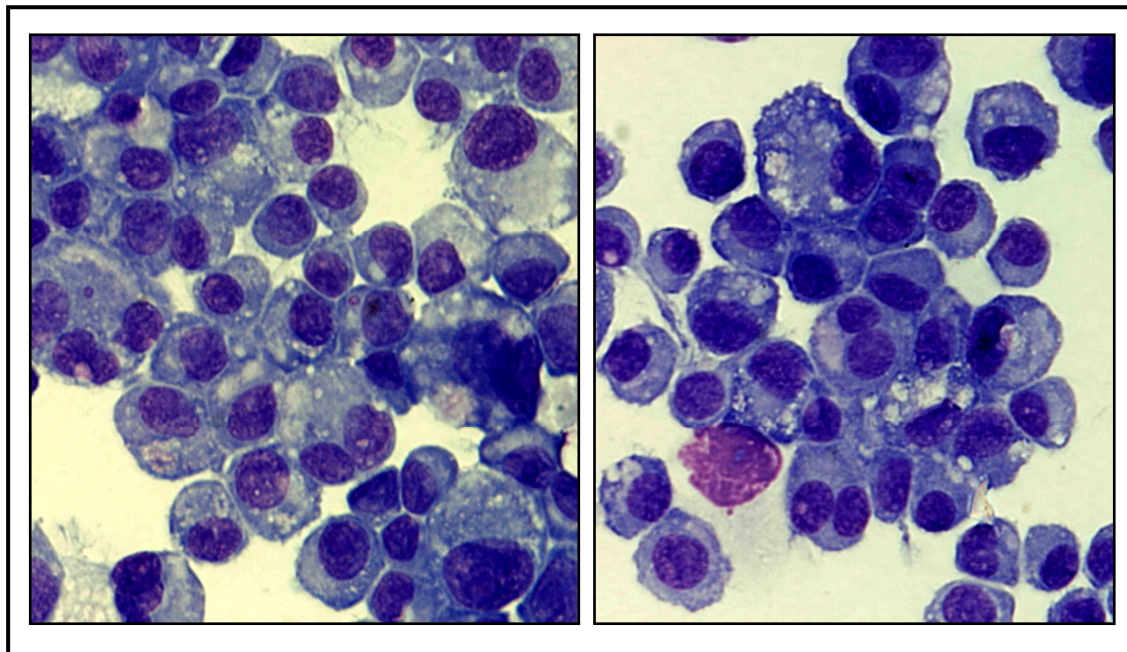


Imagen 25. Imágenes al microscopio óptico de infección de la línea celular DH82 por *E. canis* Madrid, propiedad de nuestro grupo de trabajo (Accession Number en GenBank: AY394465) teñidas mediante May-Grünwald-Giemsa (100X)

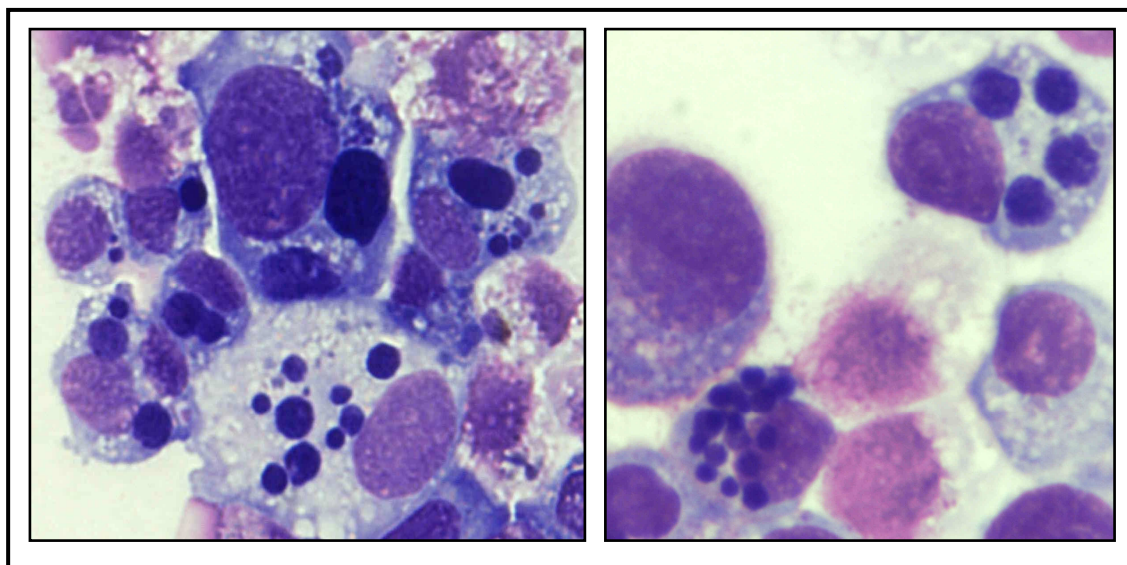


Imagen 26. Imágenes compatibles con infección por *Ehrlichia* spp. en la línea celular DH82 en dos gatos sospechosos (100X)

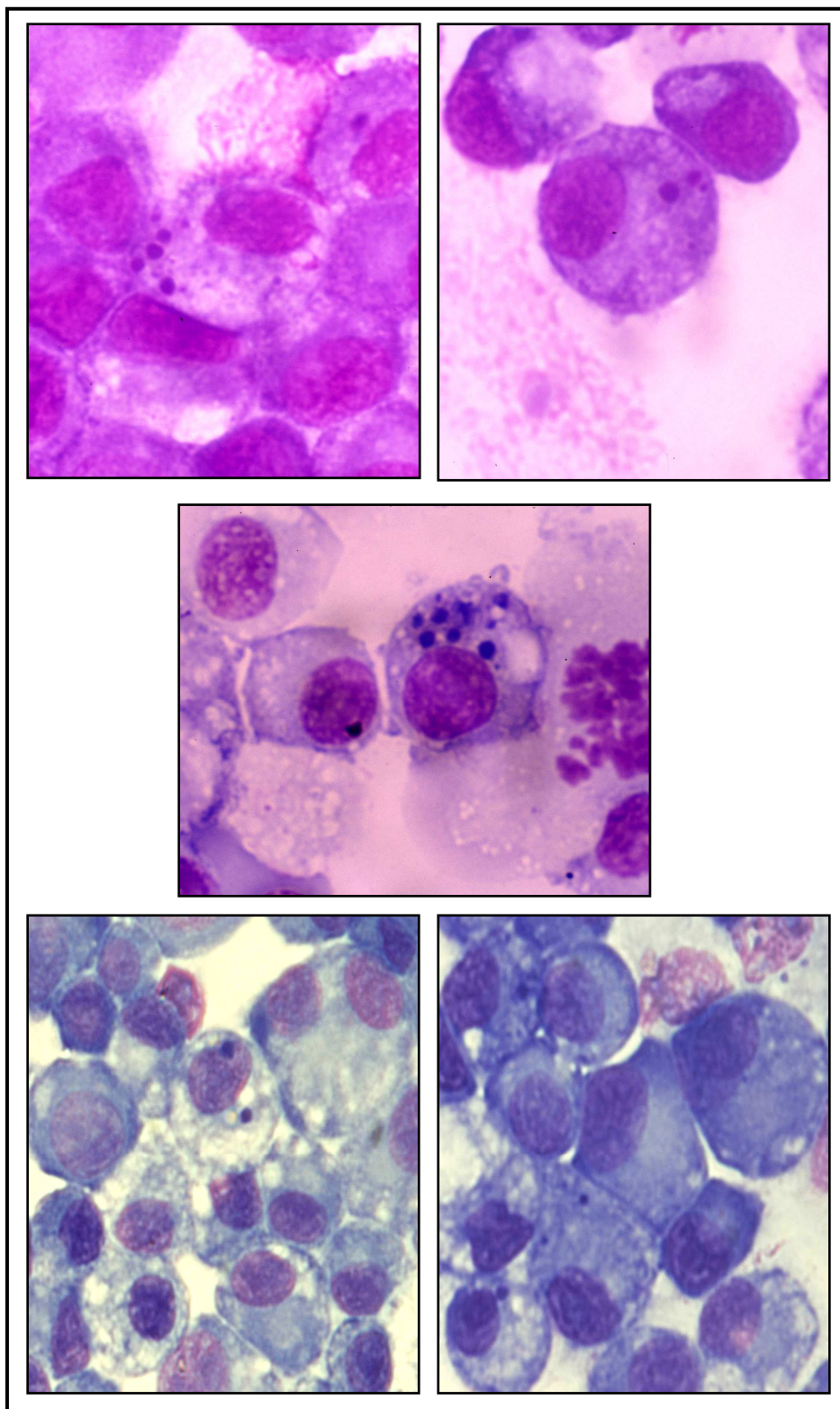


Imagen 27. Imágenes al microscopio óptico de la línea celular HL60 sin infección teñidas mediante May-Grünwald-Giemsa (40X)

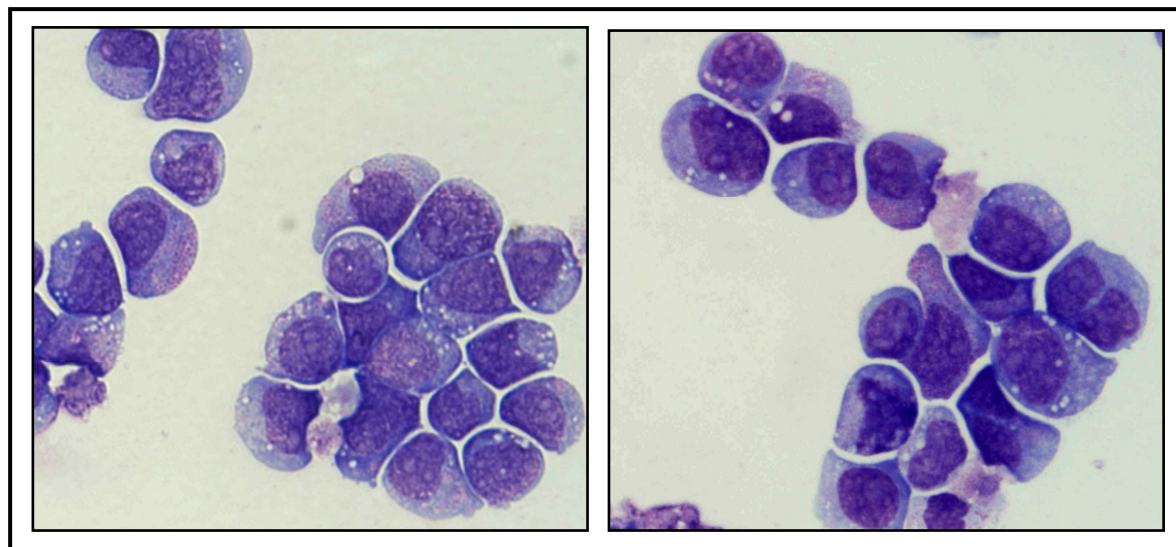


Imagen 28. Imágenes compatibles con infección por *Anaplasma* spp. en la línea celular HL60 en dos gatos sospechosos (100X)

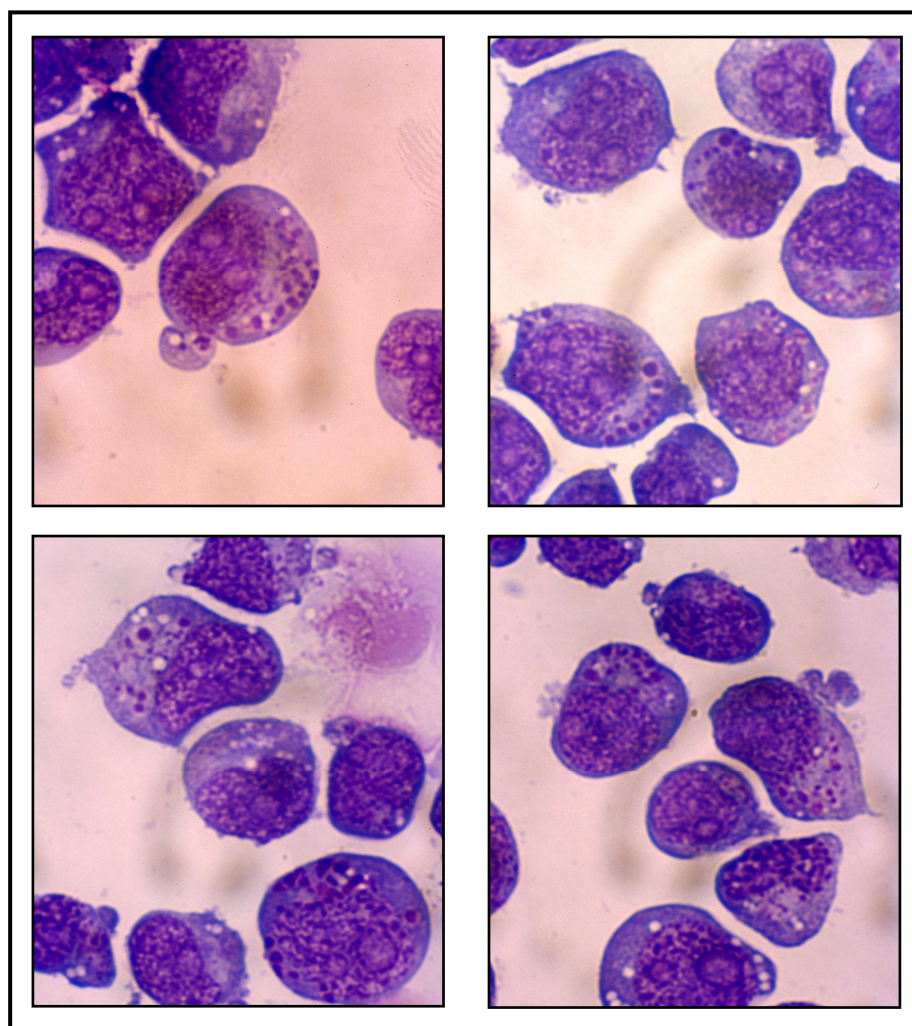
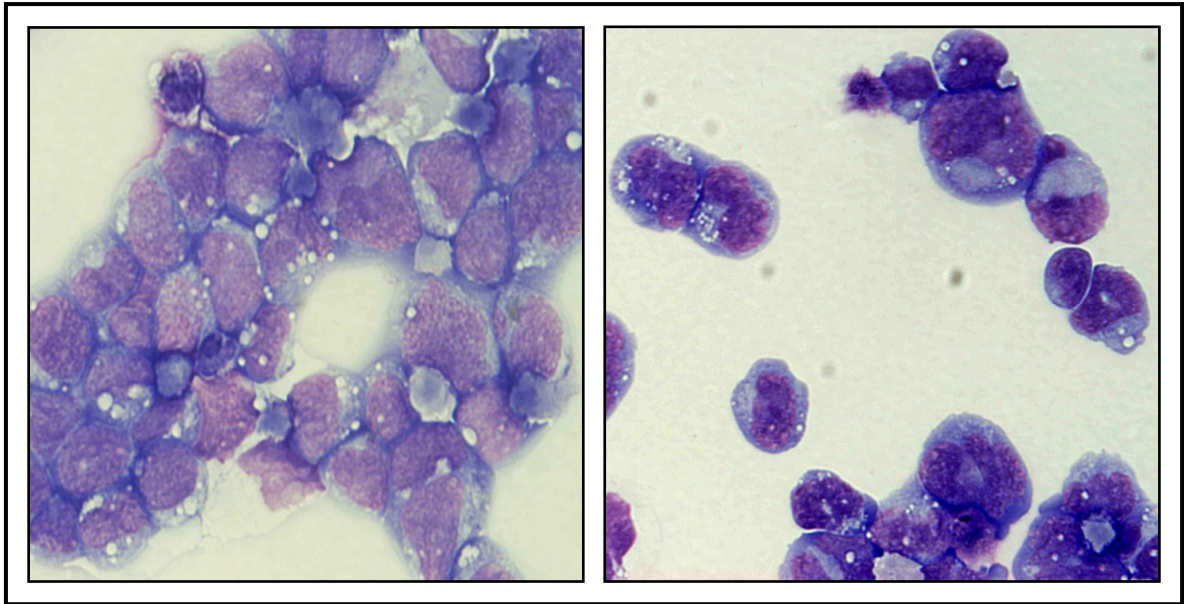


Imagen 29. Imágenes al microscopio óptico de la línea celular P388D1 sin infección teñidas mediante May-Grünwald-Giemsa (40X)



6 DISCUSIÓN

En los gatos de nuestro estudio hemos observado seroreactividad frente a los cinco agentes analizados (*E. canis*, *A. phagocytophilum*, *N. risticii*, *L. infantum* y *B. henselae*), tanto en los gatos procedentes de clínicas como en los callejeros. El mayor valor de seroprevalencia obtenido fue frente a *B. henselae*, seguido de *E. canis*, *A. phagocytophilum*, *L. infantum* y *N. risticii*.

A continuación vamos a valorar los resultados obtenidos en el presente trabajo agrupándolos por especies analizadas.

6.1.1 Ehrlichia spp.

La **seropositividad** a *E. canis* obtenida en nuestro estudio fue del $9,9 \pm 1,1\%$, lo que indica que 67 gatos de los 680 del estudio presentaban anticuerpos frente a este agente en el momento de la toma de muestra de cada animal. De ellos, 37 animales mostraban una seropositividad igual al punto de corte (1:40), mientras que el resto (30 gatos) presentaban títulos mayores. Este porcentaje obtenido es similar al encontrado en algunos estudios en otros países, como el 6% hallado en Zimbabwe (Matthewman, 1996), el 13,2% en Estados Unidos (Stubbs, 2000), o el 10,6%, 17,9% y el 11,3% descrito en diferentes estudios realizados en nuestro país (Aguirre, 2004a; Ortuño, 2005; Solano-Gallego, 2006b). Sin embargo, observamos que el valor de seroprevalencia obtenido en nuestro estudio es superior al 1% encontrado por Vita y colaboradores en Italia (Vita, 2005) y notablemente inferior al 82,4% señalado por Bouloy y colaboradores en Estados Unidos (Bouloy, 1994).

En el presente trabajo, a pesar de haberse detectado anticuerpos, **no se ha obtenido amplificación de ADN** de *Ehrlichia* spp., ni a partir de las muestras de sangre ni a partir de los sobrenadantes de los cultivos celulares empleando la línea celular DH82. Existen otros estudios en gatos que han obtenido resultados similares, obteniendo serologías positivas pero sin ser posible la amplificación a nivel molecular del agente en cuestión (Aguirre, 2004a; Vita, 2005; Solano-Gallego, 2006b). Sin embargo, algunos autores sí han conseguido la amplificación de ADN de un agente próximo a *E. canis* en algún caso (Beaufils, 2002; Breitschwerdt, 2002, 2003). Además, curiosamente, muchos de los casos

positivos por PCR a *Ehrlichia* spp. son seronegativos, habiéndose sugerido que ello se debe a alteraciones del sistema inmunitario de los gatos infectados (Breitschwerdt, 2002).

En **nuestro país** todos los intentos previos de detectar ADN de *Ehrlichia* spp. en gatos han sido fallidos (Aguirre, 2004a; Solano-Gallego, 2006b); recientemente se ha encontrado un gato positivo por PCR a *Ehrlichia/Anaplasma* spp. si bien la secuenciación no ha arrojado resultados concluyentes (Tabar, 2008). Las causas de estos resultados divergentes entre serología y PCR pueden ser múltiples. Así, al igual que defienden otros autores (Eberhardt, 2006), los gatos, aunque expuestos, puede que no estén realmente infectados por este agente, o que estén infectados pero éste se encuentre secuestrado en otros órganos, como el bazo, al igual que se ha observado en perros (Harrus, 1998d). Otra hipótesis es que el gato se haya infectado pero haya eliminado el agente, permaneciendo los anticuerpos frente al mismo en sangre. Estos resultados también se pueden explicar por cuestiones técnicas como el hecho de que no haya ninguna mórula de *Ehrlichia* spp. en los 200 µl de sangre obtenidos como muestra, o por una deficiente sensibilidad de la técnica de PCR. En cualquier caso, en todos los estudios realizados hasta el momento es mucho más habitual encontrar muestras seropositivas que animales positivos mediante PCR.

Precisamente con el fin de clarificar estos resultados divergentes, consideramos oportuno realizar intentos de **cultivo** del agente en líneas celulares. En España, el único cultivo de *Ehrlichia* spp. disponible se obtuvo a partir de un perro infectado naturalmente (Aguirre, 2004b), si bien, hasta el momento, nuestro estudio es el primero en el que se intenta dicho cultivo a partir de sangres de gato. Aunque los resultados al respecto han sido negativos, la detección de inclusiones compatibles con *Ehrlichia* spp. en algún caso esporádico, tanto en frotis sanguíneos como en algunos cultivos no nos permite descartar totalmente la infección por este agente en gatos de nuestro entorno.

En nuestro estudio no hemos observado diferencias significativas en cuanto a la procedencia de los gatos, en función de si se trataba de gatos **callejeros** o de animales procedentes de **clínicas**. Estos resultados son similares a los encontrados por otros autores, que indican que los gatos callejeros no parecen representar un mayor riesgo para los humanos que los gatos domésticos (Luria, 2004).

Por otro lado, hemos encontrado una mayor seropositividad a *E. canis* en los gatos de **raza Siamés**, si bien, como hemos comentado, la mayoría de las razas viene representada en nuestro estudio por un bajo número de animales, con lo que este dato debería ser interpretado con cautela. A este respecto, debemos comentar que en la especie canina se ha observado que la especie más susceptible de padecer la enfermedad es la raza Pastor Alemán (Nyindo, 1980), por lo que es posible, como ocurre en el perro, que exista una respuesta inmunitaria diferente en las distintas razas, también en la especie felina.

Además, observamos una mayor seropositividad a mayor **edad**, afirmación lógica si se tiene en cuenta que a mayor edad del animal, la probabilidad de contacto con el agente es mayor. Estos datos discrepan con lo encontrado por otros autores, que afirman que la raza o la edad del animal no parecen influir en la seropositividad a este agente (Beaufils, 1999; Stubbs, 2000; Ortuño, 2005; Solano-Gallego, 2006b).

Algunos de nuestros casos seropositivos a *E. canis* presentaban parasitosis externas, al igual que han observado otros autores (Buoro, 1989; Peavy, 1997; Bjöersdorff, 1999; Tarello, 2005). Sin embargo, en nuestro estudio no hemos encontrado una asociación estadística con la presencia de distintos vectores en los gatos (garrapatas y pulgas) o el contacto con pájaros y roedores, por lo que coincidimos con otros estudios en que, aunque las hipótesis sean variadas, aún **no es posible señalar el vector de transmisión** de este agente en gatos (Bouloy, 1994; Peavy, 1997).

El mayor número de gatos seropositivos se ha detectado cuando la muestra de sangre de los gatos se tomó en los meses de **mayo y noviembre**. Esta estacionalidad es similar a la observada en perros infectados por *E. canis* en el mismo entorno (Sainz, 1996b). La transmisión de *E. canis* en el perro se produce a través de la garrapata *R. sanguineus* (Groves, 1975). Esta especie de garrapata se encuentra distribuida en prácticamente todo el territorio nacional y se ha encontrado fundamentalmente en el perro, aunque también en otras especies animales como el gato, ganado vacuno, ovino, caprino, equino, etc. (Estrada-Peña, 1995). Muy probablemente esta curva bimodal podría explicarse por la dinámica de poblaciones de *R. sanguineus* en nuestro país, especie que es activa en primavera, con un descenso en su actividad durante el verano, para apreciarse un segundo incremento en otoño (Estrada-Peña, 1994; Herrero, 1994). A pesar de la naturaleza endófila de esta garrapata, las condiciones climáticas en el ambiente son

fundamentales para su desarrollo (Gray, 2009). En este sentido, algunos autores consideran que es posible que los adultos, tras pasar un período de hibernación, predominen en primavera, mientras que las larvas y ninfas lo hagan en otoño (Arthur, 1956; Herrero, 1994). Este patrón estacional encontrado en nuestro estudio también ha sido previamente descrito para la infección por *Rickettsia conorii* en el hombre en nuestro país, especie que comparte vector con *E. canis* (Herrero, 1994).

El hecho de que haya más animales seropositivos a *E. canis* que vivan en **piso** y que **no hayan salido al exterior** no parece tener fácil explicación, si bien hay que tener en cuenta que los datos recogidos de cada animal proceden de la información que nos aportan los propietarios en la mayoría de los casos, los cuales, en muchas ocasiones, desconocen u omiten el hecho de que el animal haya podido salir al exterior de la vivienda o bien que procedan del exterior de la misma, lo que podría explicar tal afirmación. Estos datos están en desacuerdo con lo observado por otros autores (Stubbs, 2000; Shaw, 2001), que observan que los gatos con acceso al exterior son con una mayor probabilidad seropositivos, lo que también coincide con lo observado por otro grupo (Ortuño, 2005) que afirma que los animales con un título mayor a 1:80 frente a este agente son todos callejeros y viven en el exterior. Estos resultados podrían entrar en contradicción con la hipotética transmisión vectorial de este agente en el gato. Ello podría deberse a la existencia de otros modos de transmisión diferentes o a que el agente que se está detectando no sea realmente *E. canis*, sino otro agente que presente reacción serológica cruzada con él.

En la misma línea, en nuestro estudio hemos encontrado una asociación entre la seropositividad a este último agente y un menor contacto con las **aves**. Existen estudios que afirman que las aves podrían tener algún papel en la transmisión de *A. phagocytophilum* (Bjöersdorff, 2001; Daniels, 2002), aunque se desconoce su papel como transmisores de *E. canis*.

No hemos observado una asociación con el padecimiento de enfermedades concurrentes, como las causadas por los virus **FeLV**, **FIV** o **PIF**, con lo que la infección por *E. canis*, al igual que afirman otros autores (Beaufils, 1999; Solano-Gallego, 2006b) no está necesariamente ligada a la previa infección por estos virus.

En la especie canina, así como en la felina, se han descrito multitud de signos clínicos asociados a la infección por *E. canis*. Sin embargo, en nuestro estudio un mayor porcentaje de seropositivos a este agente **no presenta síntomas clínicos** de tipo **general**, lo que parece estar en concordancia con lo observado por Solano-Gallego y colaboradores, que asocian la seropositividad a *E. canis* con los animales sanos (Solano-Gallego, 2006b). Tampoco se han observado asociaciones con el resto de signos clínicos estudiados, como son los digestivos, cardiorrespiratorios, oculares, renales, locomotores, neurológicos u otros signos, aunque algunos autores afirman que los gatos seropositivos a este agente tienen con mayor probabilidad problemas oculares y poliartritis (Stubbs, 2000). Por tanto, no parece que este agente produzca enfermedad clínica grave en el gato.

En cuanto a los datos analíticos, se ha observado que los animales seropositivos tienen en mayor proporción el valor del **hematocrito** elevado, lo que podría explicarse por una deshidratación del animal. Este dato no se ha descrito previamente en muchos estudios de ehrlichiosis, que describen básicamente anemia tanto en gatos (Charpentier, 1986; Buoro, 1989; Beaufils, 1995, 1999; Stubbs, 2000; Breitschwerdt, 2002; Aguirre, 2004a) como en perros (Kuehn, 1985; Harrus, 1997c; Frank, 1999), si bien la deshidratación también se ha descrito previamente (Bouloy, 1994; Beaufils, 1997).

A pesar de que sea frecuente encontrar una **trombocitopenia** en la ehrlichiosis canina (Huxsoll, 1979; Troy, 1980; Waddle, 1988; Woody, 1991; Ristic, 1993; Harrus, 1997c; Frank, 1999), en nuestro estudio no hemos encontrado asociación con este valor, aunque sí hayamos detectado casos con trombocitopenia marcada, en los que no existía otra posible causa de trombocitopenia conocida.

Las proteínas totales también aparecen aumentadas en mayor proporción en los gatos seropositivos, hecho que también podría deberse a una deshidratación. No obstante, en la ehrlichiosis canina, también se describe habitualmente **hiperproteinemia** originada por una hiperglobulinemia, a su vez producida por una hipergammaglobulinemia (mono o policlonal) por un aumento en la respuesta humoral frente al agente (Troy, 1980; Kuehn, 1985; Codner, 1986; Waddle, 1988; Harrus, 1997c; Sainz, 1998). Esta alteración también se ha descrito en el gato en varios estudios (Buoro, 1989; Bouloy, 1994; Beaufils, 1995, 1997; Stubbs, 1998, 2000; Aguirre, 2004a, Tarello, 2005).

El valor de **creatinina** aparece elevado en más casos seropositivos a *E. canis*, dato esperable teniendo en cuenta que estos agentes pueden producir alteraciones renales, como observamos en perro (Troy, 1980; Codner, 1992) o en gato (Beaufils, 1997; Stubbs, 1998, 2000; Aguirre, 2004a), tanto con origen pre-renal como con origen renal.

En los **árboles de decisión** y mediante el cálculo de la *Odd's ratio* hemos observado que el porcentaje de seropositividad frente a este agente es más elevado y la probabilidad de que un gato sea seropositivo a *E. canis* es 2,72 veces mayor en aquellos animales que presentan un valor de proteínas elevado y padecen otro tipo de signos clínicos. Estos resultados tienen cierta lógica, especialmente si tenemos en cuenta que la hiperproteinemia es un síntoma característico de estas enfermedades y que se han descrito multitud de síntomas clínicos incluidos en ese grupo en gatos; por tanto, la combinación de ambos factores puede resultar de utilidad desde un punto de vista diagnóstico.

Con todos estos datos, podemos concluir, por un lado, que **existe exposición** de los gatos de la Comunidad de Madrid a *E. canis*. Sin embargo, observamos que más de la mitad de los animales seropositivos del estudio tienen un título de seropositividad bajo. Este último dato, unido al hecho de que no se ha detectado este agente molecularmente en estos gatos, sugeriría que la existencia de infección activa podría ser limitada en la especie felina en nuestro entorno geográfico. Además, esta infección no parece causar signos clínicos importantes, si bien se asocia a alteraciones laboratoriales como hiperproteinemia y un aumento en el valor de la creatinina. Por tanto, consideramos que *E. canis* no parece producir enfermedad clínica grave en los gatos, coincidiendo con lo que afirman otros autores (Troy, 1990; Kordick, 1995). Aunque no se haya podido detectar *E. canis* en la sangre de los gatos (por medio de la PCR o del cultivo) en los casos seropositivos y seronegativos, la posibilidad de que existan falsos negativos en estas técnicas o de que se produzcan reacciones cruzadas por otros agentes, hace que el papel del gato en la infección por *E. canis* quede aún por aclarar.

6.1.2 Anaplasma spp.

El $8,4 \pm 1,1\%$ de la población de gatos presentaba **anticuerpos** frente a *A. phagocytophilum*, lo que indica exposición de los gatos de nuestro estudio a dicho agente o a otro similar. En este caso también observamos un elevado número de animales seropositivos con título igual al punto de corte. Este valor de seroprevalencia obtenido es superior al observado por otros autores de nuestro país, como el 4,9% de seroprevalencia en una población más reducida de gatos en Madrid (Aguirre, 2004a) o el 1,8% obtenido por Solano-Gallego y colaboradores en el norte de España y Baleares (Solano-Gallego, 2006b), así como de otros países, como Estados Unidos, que muestran un 4,3% de seroprevalencia frente a este agente (Billeter, 2007), en Italia, que obtienen un 6% (Tarello, 2005) o en Reino Unido, con un 1,6% de seroprevalencia (Shaw, 2005). Sin embargo, existe un estudio en Estados Unidos que muestra una seroprevalencia claramente superior a la obtenida en nuestro estudio, observándose un 30-38% de animales seropositivos (según técnica) (Magnarelli, 2005).

Por otro lado, en este caso tampoco ha sido posible la detección **molecular** de este agente, a pesar de que otros autores sí han sido capaces de amplificar su ADN en gatos (Bjöersdorff, 1999; Foley, 2003; Lappin, 2004; Shaw, 2005). A la vista de estos resultados, es posible que los gatos de nuestro entorno estén infectados pero no se detecte ADN del agente porque éste se encuentre secuestrado en otros órganos o por una deficiente sensibilidad de la técnica de PCR. Otra posibilidad, coincidiendo con Billeter y colaboradores (Billeter, 2007), es que exista reacción cruzada con *A. platys* y que ésta sea realmente la especie detectada. En este sentido, el vector de transmisión de *A. phagocytophilum* es *Ixodes* spp. (Parola, 1998), garrapata que es poco habitual en la zona centro de España. En concreto, en nuestro país es habitual encontrar *I. ricinus*, especialmente en zonas húmedas (Estrada-Peña, 1994). En perros y gatos se han descrito las especies *I. ricinus* e *I. hexagonus*, aunque especialmente en el norte de España y en Extremadura (Estrada-Peña, 1995). Por el contrario, *A. platys* está presente en perros en el centro de España (Sainz, 1999; Aguirre, 2006) y se piensa que se transmite igualmente por la garrapata *R. sanguineus* (Hibler, 1986), que es más ubicua en el territorio nacional (Estrada-Peña, 1995) y que es mucho más probable de encontrar en Madrid, dadas las condiciones climáticas. Por tanto, aunque no podemos afirmar que *R. sanguineus* sea el

vector de estos agentes en el gato, cabe la posibilidad de que realmente la especie que estemos detectando sea *A. platys* en lugar de *A. phagocytophilum*.

Tampoco se ha advertido crecimiento alguno en la línea celular HL60, específica para este agente (Goodman, 1996; Heimer, 1997; Bjöersdorff, 2002), aunque hemos observado inclusiones dudosas en dicha línea celular. Esto, unido a la detección en frotis de alguna inclusión intracitoplasmática en granulocitos sanguíneos, hace que no podamos descartar totalmente la presencia de infección por este agente en la especie felina en nuestro entorno.

En cuanto a la presencia de asociaciones estadísticas, se ha observado un mayor porcentaje de animales seropositivos que proceden de **clínica**. Este dato no es esperado, ya que presuponemos que los gatos callejeros tienen más contacto con los vectores artrópodos y con ello una mayor posibilidad de infección por los agentes objeto de estudio, que los animales que acuden a la clínica. No obstante, debemos comentar al respecto que Luria y colaboradores (Luria, 2004) han observado que los gatos domésticos y callejeros tienen una prevalencia similar frente a este agente, afirmando que los gatos callejeros no suponen un mayor riesgo de infección para el hombre.

De modo similar a lo encontrado con *E. canis*, observamos también una mayor población seropositiva en el mes de **noviembre**, y en el **otoño**, siendo menor en febrero. Este hecho podría explicarse por la dinámica de poblaciones de garrapatas, y en concreto de *Ixodes ricinus*, en nuestro entorno, que muestra especialmente un pequeño pico de actividad de los adultos en primavera y otro mayor en otoño (Estrada-Peña, 2004). Además, la existencia de casos seropositivos durante el otoño también podría deberse a una vida media limitada de estos anticuerpos, por lo que con la serología estaríamos detectando especialmente animales expuestos recientemente a este agente. En este sentido, algunos autores consideran que, al contrario de lo descrito para *E. canis* (Perille, 1991; Bartsch, 1996), los anticuerpos frente a *A. phagocytophilum* podrían desaparecer en un breve espacio de tiempo, incluso sin necesidad de tratamiento (Dumler et al, 1996).

Además, la seropositividad a *A. phagocytophilum* es mayor en los gatos que han **salido menos de casa**, dato que podría cuestionar igualmente la transmisión vectorial de este agente en el gato, si bien, y como hemos mencionado para el caso de *E. canis*, podría

estar influenciado por la información que nos proporciona el dueño, pudiéndose omitir la posibilidad de que el animal tenga algún tipo de acceso al exterior. Por otro lado, un estudio muy reciente en personas sugiere la posibilidad de otras vías de transmisión diferentes a la vectorial para *A. phagocytophilum*, como es la nosocomial (Zhang, 2008), por lo que cabría la posibilidad de este tipo de transmisión en los animales.

Como cabría esperar por la especie de la que se trata, existe una asociación entre la seropositividad a este agente y el padecimiento de signos clínicos de tipo **locomotor**, característico de las especies granulocíticas (*A. phagocytophilum* y *E. ewingii*) en perros (Greig, 1996), si bien, no se ha descrito en gatos aún. Aunque se han descrito casos de gatos positivos a este agente con sintomatología locomotora (Tarello, 2005; Magnarelli, 2005), otros autores no encuentran ninguna asociación con el padecimiento de signos clínicos (Shaw, 2005), o no encuentran diferencias estadísticas entre sanos o enfermos (Magnarelli, 2005; Solano-Gallego, 2006b).

En este caso, en los **árboles de decisión** y mediante el cálculo de la *Odd's ratio* observamos que la probabilidad de que un gato sea seropositivo a *A. phagocytophilum* es 5,65 veces mayor en animales valorados en otoño con un valor de glóbulos rojos elevado. La importancia de la época del año en la seropositividad frente a este agente acaba de ser analizada. El incremento del valor de glóbulos rojos podría ser un signo de deshidratación que potencialmente se asociaría a infecciones recientes por este agente.

Como conclusión, para *A. phagocytophilum* hemos observado una **exposición** de los gatos de nuestro estudio a este agente u otro similar por métodos serológicos, hecho que además se ha descrito en perros en España (Sainz, 2000a; Solano-Gallego, 2006a; Amusategui, 2008). Además, hemos encontrado que los gatos seropositivos tienden a tener síntomas locomotores, que son típicos de la infección por *A. phagocytophilum*. Sin embargo, el hecho de no detectarse molecularmente este agente en nuestro estudio, que la seroprevalencia obtenida en nuestro estudio no es muy elevada, que la mayoría de los títulos detectados son bajos, y que su vector de transmisión es más frecuente en el Norte de España, cabría la posibilidad de que el agente detectado serológicamente en nuestro estudio sea, en realidad, *A. platys*, que, como hemos comentado, es un agente detectado mucho más habitualmente en perros de nuestro entorno (Sainz, 1999; Aguirre, 2006).

6.1.3 *Neorickettsia* spp.

El valor de **seroprevalencia** obtenido para esta especie fue tan sólo del $1 \pm 0,4\%$, observándose únicamente 7 animales con reacción serológica frente a este agente, siendo sólo uno de ellos claramente positivo en cuanto al título de anticuerpos. Este valor obtenido es muy inferior al observado por Bouloy y colaboradores en Estados Unidos, en el que un 52,9% de una población de gatos que vivían en el entorno geográfico de un gato clínica y serológicamente positivo a *E. canis* y *N. risticii*, presentaba anticuerpos frente a este último agente (Bouloy, 1994) o bien el 64,5% observado por Stubbs y colaboradores en el mismo país (Stubbs, 2000). Sin embargo, en España otros autores muestran un porcentaje de seropositividad similar al nuestro, como Aguirre y colaboradores, que obtuvieron tan solo un 2,4% de animales seropositivos a *N. risticii* (Aguirre, 2004a).

En este caso tampoco ha sido posible la **amplificación** de ADN de *Neorickettsia* spp. en ninguno de los gatos analizados, ni se han observado inclusiones compatibles con la infección por este agente en los cultivos celulares, por lo que no detectamos infección activa por *N. risticii* en los gatos del estudio. A este respecto, otros estudios que tratan de detectar este agente en gatos se basan en análisis serológicos, observación de signos clínicos, en algún caso, detección de cuerpos de inclusión compatibles con este agente e intento de detección mediante PCR, aunque sin resultados satisfactorios (Bouloy, 1994; Peavy, 1997; Stubbs, 1998, 2000; Aguirre, 2004a). Por tanto, aunque se observa exposición a *N. risticii* u otro agente próximo en un número limitado de gatos, especialmente en otros países, en ningún caso se ha detectado este agente molecularmente en esta especie animal.

En nuestro estudio no hemos encontrado asociaciones estadísticas con ninguna de las restantes variables incluidas en el estudio, salvo el hecho de que todos los animales seropositivos a *N. risticii* eran **hembras**, dato que es difícil de explicar y que podría tratarse de una coincidencia, dado también el escaso número de animales seropositivos obtenidos.

No hemos observado ninguna influencia del **hábitat** ni ninguna relación con la presencia de **signos clínicos** en los animales seropositivos, al contrario de lo que describen otros autores en gatos (Stubbs, 2000; Shaw, 2001). En cualquier caso, los signos que causa este agente en perros son en general de tipo leve y muchas veces inespecíficos (Ristic, 1988; Kakoma, 1994). Tampoco parece que enfermedades concurrentes del tipo de **FeLV**, **FIV** o **PIF** influyan en la seropositividad a este agente en nuestro estudio.

En los **árboles de decisión** y mediante el valor de *Odd's ratio* obtenido encontramos que el porcentaje de seropositividad es más elevado y que la probabilidad de que un gato sea seropositivo frente a *N. risticii* es 7,66 veces mayor en las hembras que presentaban un hematocrito normal o bajo y signos cardiorrespiratorios. La interpretación de estos resultados viene dificultada, especialmente, por el bajo número de animales positivos a este agente en nuestro estudio y también por los escasos estudios clínicos previamente realizados al respecto. Además, los signos clínicos descritos en la especie felina son inespecíficos: fiebre, depresión, anorexia, linfadenopatía, diarrea intermitente, vómitos, y alteraciones analíticas (Dawson, 1988; Peavy, 1997; Stubbs, 1998, 2000).

A pesar de que muchos estudios han señalado la susceptibilidad del gato a la infección por *N. risticii* (Dawson, 1988; Bouloy, 1994; Peavy, 1997; Stubbs, 1998, 2000; Aguirre, 2004a), la mayoría de ellos realizados en Estados Unidos, donde se han encontrado valores elevados de seroprevalencia frente a *N. risticii*, en nuestro país los valores obtenidos de seroprevalencia frente a este agente son muy bajos, lo que, junto al hecho de que no se haya encontrado ningún tipo de asociación, salvo con el sexo del animal, y el que no haya sido posible la amplificación de esta especie a nivel molecular, ni en cultivo celular, nos hace pensar que si este agente se encuentra realmente en nuestro entorno, su distribución sea muy limitada.

6.1.4 Leishmania spp.

El valor de **seroprevalencia** obtenido frente a este agente en nuestro estudio es del **3,7 ± 0,7%**. Además, la mayoría de los animales ha presentado serorreactividad a un título

bajo (1:50), habiendo 5 animales que presentaban un título de 1:100 y 2 con un título de 1:400.

La mayoría de los estudios acerca de *Leishmania* spp. en gatos se limitan a describir casos afectados por este agente, comentando los hallazgos clínicos, laboratoriales y diagnósticos de detección de este agente en los gatos, habiéndose realizado escasos estudios de seroprevalencia en la especie felina y muy escasos estudios estadísticos al respecto.

Comparativamente con otros estudios realizados en gatos, observamos que el porcentaje obtenido en nuestro estudio es menor al observado por otros autores, como el 8,3% encontrado en Egipto (Morsy, 1994), el 16,3% de Italia (Vita, 2005), el 25% de Brasil (da Silva, 2008) o el 17,4% de Portugal (Maia, 2008). La divergencia de resultados con estos trabajos puede deberse a los bajos puntos de corte empleados en algunos de ellos (Morsy, 1994; Vita, 2005; Maia, 2008) o a la pequeña muestra de animales analizados (da Silva, 2008). Por el contrario, nuestro valor de seroprevalencia es mayor al observado por Poli y colaboradores en Italia, que encontraron tan sólo un animal seropositivo en una población de 110 gatos (0,9%) (Poli, 2002). En España, la tasa de seroprevalencia que hemos obtenido concuerda mucho más con el 5,25-6,29% (según técnica ELISA) encontrado en Barcelona por Solano-Gallego y colaboradores (Solano-Gallego, 2007), que con el 60% obtenido en el Sur del país (Martín-Sánchez, 2007). Nos podría sorprender este valor de seroprevalencia tan elevado de este último estudio, si bien hay que tener en cuenta que estos autores consideran seropositivos aquellos casos en los que se observa reacción serológica a un título $\geq 1:10$, mientras que el porcentaje de seropositivos disminuye considerablemente cuando estos autores consideran un título mayor y más empleado (1:40).

Si nos remitimos a los valores de seroprevalencia de *Leishmania* spp. en perros en nuestro país, observamos distintos valores según la zona y, como hemos comentado con anterioridad, podemos encontrar valores que van desde el 2,4% encontrado en Murcia hasta el 34,6% encontrado en Málaga (Segovia, 1985; Morillas, 1996; Fisa, 1999; Solano-Gallego, 2001a; Amusategui, 2004; Fernández-Bellón, 2008). En la Comunidad de Madrid, los valores de seroprevalencia en perros también han ido variando con los años, como comentamos en el apartado de revisión bibliográfica de esta enfermedad, observando

una tasa del 5% de seroprevalencia en los años 90 (Celaya, 1993), o el 7,8% obtenido en un estudio de 10 años en perros de Madrid (Miró, 2007), datos que no están muy distantes de lo obtenido en los gatos en nuestro estudio, al igual que sostienen Maroli y colaboradores (Maroli, 2007).

En nuestro trabajo se ha demostrado mediante métodos **moleculares** la presencia de *L. infantum* en sangre de cuatro animales (0,6%). Este último dato nos muestra, como cabe esperar, que la especie de *Leishmania* que afecta a nuestra población de gatos es la misma que la que se ha encontrado en otros estudios y que está presente en la Cuenca Mediterránea (Ozon, 1998; Poli, 2002; Grevot, 2005; Grevot, 2005; Vita, 2005; Maroli, 2007; Maia, 2008), incluida España (Solano-Gallego, 2007; Martín-Sánchez, 2007; Tabar, 2008). El porcentaje de animales molecularmente positivos a *Leishmania* spp. en nuestro estudio es inferior al observado en otros trabajos realizados en España (Martín-Sánchez, 2007; Solano-Gallego, 2007; Tabar, 2008), si bien el tamaño de muestra de nuestro trabajo es mucho mayor, lo que podría influir en los resultados. En un estudio realizado en 203 gatos en Italia (Vita, 2005), observaron que al realizar la PCR para este agente a partir de sangre, se obtenían menos casos positivos que a partir de ganglio. Nos parece importante señalar este dato ya que en nuestro estudio tan sólo se dispone de muestras de sangre de los gatos y la PCR era efectuada a partir de dichas muestras o de los cultivos celulares inoculados con la sangre de los animales, por lo que cabría la posibilidad de que realmente haya más infección activa de lo que se piensa en nuestros gatos.

Como es de esperar, la prevalencia frente a *L. infantum* aumenta con la **edad** del animal, observándose mayor número de seropositivos a este agente en animales mayores. Este dato es lógico, si tenemos en cuenta que a mayor edad, la probabilidad de contacto con el agente es mayor. En perros también se ha observado esta influencia de la edad (Martínez, 1992; Ozon, 1995; Miró, 2007). Aunque no está confirmado, se piensa que la transmisión de esta enfermedad en gatos se produce también por medio de flebotomos (Maroli, 2007); por tanto, la probabilidad de exposición a estos insectos sería, en su caso, mayor con la edad. Pennisi y colaboradores, en un estudio realizado en 89 gatos, también observan un mayor porcentaje de animales positivos a mayor edad, lo que concuerda con nuestros resultados (Pennisi, 2002).

En perros, algunos autores han descrito influencias de la **raza** y el **sexo** en el padecimiento de estas infecciones (Slappendel, 1988; Denerolle, 1996; Denerolle, 1996; Solano-Gallego, 2000; Amusategui, 2003), si bien tal asociación no la hemos encontrado en nuestro estudio en gatos.

Tampoco observamos una influencia **estacional** en la seropositividad a este agente en los gatos de nuestro estudio. El vector de transmisión para este agente en perros, el flebotomo, es activo en los meses cálidos, de primavera a otoño (Killick-Kendrick, 1990), habiéndose observado dos picos más relevantes de transmisión, uno entre Junio y Julio y otro entre Agosto y Septiembre en perros, siendo este último el de mayor riesgo (Conesa-Gallego, 1997). Sin embargo, existen estudios en perros que no encuentran una influencia del clima en la presentación de estas infecciones (Fernández-Bellón, 2008), por lo que el no encontrar dicha influencia estacional en nuestro estudio podría ser, de algún modo, esperable.

En cuanto a la presencia de enfermedades concurrentes, como **FeLV** o **FIV** y **PIF**, en nuestro estudio, hemos encontrado algunos casos positivos a *L. infantum* y también a estos virus. Al realizar el estudio estadístico, la seropositividad al virus de la inmunodeficiencia felina (**FIV**) se asocia estadísticamente con la seropositividad a *L. infantum*. En los estudios de leishmaniosis en gatos realizados por otros autores, existen casos tanto positivos como negativos a FeLV y FIV, no estando claro aún el papel que pudieran tener estos virus en la presentación de la enfermedad, si bien tan sólo unos pocos estudios analizan estadísticamente la asociación con estas virosis. Así, Vita y colaboradores, Solano-Gallego y colaboradores y Martín-Sánchez y colaboradores no observan asociación con la presencia de FeLV o FIV en sus estudios (Vita, 2005; Solano-Gallego, 2007; Martín-Sánchez, 2007). Por el contrario, en Italia, Pennisi y colaboradores, al igual que nosotros, observan una asociación entre la seropositividad a *L. infantum* y la infección por FIV (Pennisi, 2002). Poli y colaboradores (Poli, 2002) afirman que tan sólo la presencia de este tipo de virus en el animal no es suficiente para demostrar un estado de inmunodeficiencia, por lo que sería necesario valorar el sistema inmunitario mediante otro tipo de pruebas. Por el contrario, Hervás y colaboradores (Hervas, 1999) señalan en su artículo la posible disfunción inmunitaria producida por estos virus, lo que podría justificar la coinfección por otros agentes, como el virus de la inmunodeficiencia felina.

Diversos estudios han descrito casos tanto sintomáticos como asintomáticos de leishmaniosis en gatos. Muchos de los **signos clínicos** observados en los animales seropositivos a este agente en nuestro estudio son similares a los encontrados en perros, y también coinciden con los observados por otros autores en gatos. A pesar de que no encontremos asociaciones estadísticas con la mayoría de los signos clínicos, nos hemos encontrado en nuestros gatos seropositivos anorexia, pérdida de peso, depresión, mucosas pálidas, vómitos, diarreas, hepatopatías, hepatomegalia, cuadros respiratorios, problemas oculares (uveítis, úlcera corneal y secreción ocular), polidipsia y poliuria, así como problemas de piel y bucales (gingivoestomatitis y periodontitis), en el momento de la toma de muestras de sangre. En cuanto a las alteraciones analíticas, observamos en los gatos seropositivos casos de anemia, leucocitosis o leucopenia, hiperglicemia, valores altos de los niveles de urea y creatinina, hiperproteinemia, aumento en los valores de enzimas hepáticas y trombocitopenias. Estas alteraciones podrían deberse a la infección por *Leishmania* spp. Sin embargo, no observamos asociaciones estadísticas con los síntomas clínicos, salvo con los de tipo “otros”. Estos “**otros signos**” son en su mayoría problemas inespecíficos, especialmente bucales, pero también dermatológicos y de otro tipo. Resulta interesante comprobar cómo entre los signos clínicos que se han descrito previamente en la infección por *Leishmania* spp. en el gato, son habituales los cuadros cutáneos y las gingivoestomatitis (Craig, 1986; Barnes, 1993; Laruelle-Magalon, 1996; Passos, 1996; Ozon, 1998, Hervas, 1999; Poli, 2002; Schubach, 2003; Savani, 2004; Simoes-Mattos, 2005; Rufenacht, 2005, de Souza, 2005; Leiva, 2005, Dalmau, 2008). No obstante, debemos tener en cuenta que otra de las variables asociadas a la seropositividad a *Leishmania* spp. es la positividad a FIV, agente que también causa gingivoestomatitis (Ayala, 1998), por lo que este signo también podría deberse al efecto directo de este virus.

La asociación con una **linfocitosis** relativa parece ser un hallazgo ocasional, ya que no se han encontrado otras asociaciones con el valor leucocitario y, además, aunque algunos autores sí lo han observado en perros (Keenan, 1984), no hemos encontrado este hallazgo en otros estudios de leishmaniosis felina.

El hecho de encontrar una asociación con el valor elevado de la enzima **hepática** ALT puede explicarse porque ha sido descrita con frecuencia la existencia de alteraciones hepáticas en gatos (Hervas, 1999; Pennisi, 2002), si bien es raro encontrar problemas hepáticos en estas infecciones en perros (Cabassu, 1988b; Gascón, 1994). Debe tenerse en

cuenta que muchos gatos enfermos presentan anorexia o apetito caprichoso, que puede dar lugar a un incremento en las transaminasas, de forma más habitual que en la especie canina.

Aunque hayamos señalado que es posible que la infección por *Leishmania* spp. en gatos pueda ser mayor de lo que se piensa en nuestro estudio, con todos los resultados obtenidos nuestro equipo está inclinado a pensar que existe una **baja susceptibilidad** de estos animales o una resistencia natural a la infección por *Leishmania* spp., tal y como también afirman otros autores (Vita, 2005). A pesar de que Madrid es un área endémica para la leishmaniosis, el hecho de obtener una baja seroprevalencia frente a *L. infantum* en nuestros animales, la mayoría a títulos bajos, el no encontrar infección activa más que en cuatro animales y el no encontrar una sintomatología y alteraciones analíticas claras asociadas a estas infecciones, nos hace pensar que *L. infantum* parasita accidentalmente al gato. No obstante, con nuestro estudio se confirma la presencia de *Leishmania* spp. en gatos de nuestro entorno geográfico. Así, parece que el perro sí es reservorio de este agente para otras especies animales y el hombre, tal y como muestran muchos estudios, pero el gato es, en nuestra opinión, un **hospedador accidental**, que raramente padece la enfermedad, al igual que opinan varios autores (Passos, 1996; Gramiccia, 2005) y al contrario de lo que piensan otros (Morsy, 1980; Pennisi, 2002; Martín-Sánchez, 2007; Solano-Gallego, 2007; da Silva, 2008; Maia, 2008).

La visualización de los parásitos en frotis o bien su cultivo sería bastante recomendable para dar un diagnóstico definitivo de esta parasitosis, tal y como exponen Laruelle-Magalon y colaboradores (Laruelle-Magalon, 1996).

6.1.5 *Bartonella* spp.

En nuestro estudio hemos encontrado un **23,8 ± 1,6%** de los animales que presentaban reacción **serológica** frente a *B. henselae*, siendo éste el agente en el que la tasa de seroprevalencia fue mayor entre todos los estudiados. La mayoría de los animales presentaban un título igual al punto de corte, si bien algunos gatos presentaban títulos superiores. Comparativamente con otros estudios, observamos que nuestro valor de

seropositividad es superior al encontrado en países como Suiza, en el que han observado un 8% de seroprevalencia frente a este agente (Glaus, 1997), en Noruega, con un 0% de seroprevalencia (Bergh, 2002) o en Japón, en el que observan un 15% de seroprevalencia (Ueno, 1995). Nuestro valor de seroprevalencia obtenido es más similar al observado en países como Sudáfrica, con un 21% (Kelly, 1996), o Zimbabwe, con un 24% (Kelly, 1996). Sin embargo, es inferior al observado en otras zonas, como Italia, donde observan un 38% de seroprevalencia (Fabbi, 2004), Israel, con un 40% de gatos seropositivos (Baneth, 1996), Francia, con un 41% (Gurfield, 2001), Hawaii, con un 47% (Demers, 1995), Singapur, con un 48% (Nasirudeen, 1999), Indonesia, con un 54% (Marston, 1999), los Países Bajos, con un 56% (Bergmans, 1997), Filipinas, con un 68% (Boulois, 2005) o California, con un 81% (Chomel, 1995). *Bartonella* spp. está influenciada, según algunos autores, por el clima, observándose en teoría valores más elevados de seroprevalencia en zonas con un clima cálido y húmedo (Jameson, 1995; Chomel, 2006). Revisando las tasas de seroprevalencia mostradas, parece evidente que los porcentajes más bajos se presenten en zonas frías, si bien este hecho no siempre se cumple, como muestra el porcentaje de seropositividad hallado en los Países Bajos.

En España, los escasos estudios de seroprevalencia de *Bartonella* spp. en gatos muestran valores variables. La tasa obtenida en nuestro estudio es similar a la observada por Pons y colaboradores en Cataluña, con un 29,6% de seroprevalencia en gatos (Pons, 2005) y, sin embargo, es marcadamente inferior al 71,4% observado por otros autores también en Cataluña (Solano-Gallego, 2006b). Según estos últimos autores, las elevadas diferencias en los valores de seroprevalencia de los distintos estudios realizados en España podrían ser debidas a diferentes tiempos de recogida de las muestras, diferencias demográficas de la población (áreas rurales o urbanas) o diferencias en la técnica de IFI entre laboratorios (Solano-Gallego, 2006b), siendo en nuestra opinión este último factor muy importante dada la dificultad de lectura de la inmunofluorescencia para la detección de anticuerpos frente a *Bartonella*.

El **cultivo** a partir de la sangre es uno de los métodos empleados para identificar los gatos bacteriémicos. En nuestro estudio no hemos realizado el cultivo de este agente, ya que estas bacterias se aislan en cultivos con mucha dificultad, incluso en gatos bacteriémicos, siendo difícil obtener resultados satisfactorios en animales competentes no reservorios, debido probablemente al escaso número de bacterias circulantes en la sangre

(Rolain, 2001; Gouriet, 2005). En este sentido, una alternativa válida es la PCR, que también demuestra su utilidad para determinar la presencia de *Bartonella* spp. en sangre.

En nuestro estudio hemos obtenido **amplificación** de ADN de *Bartonella* spp. en tan sólo dos casos (0,3%), siendo las especies amplificadas *B. henselae* **Houston-1** y *B. clarridgeiae*, con lo que demostramos la presencia de estos dos agentes en el centro de nuestro país. Estas dos especies ya han sido previamente identificadas en otras zonas del Norte de España (Pons, 2005; Solano-Gallego, 2006b; Tabar, 2008). El porcentaje de amplificación de *B. henselae* y *B. clarridgeiae* en los gatos de nuestro estudio es, de nuevo, inferior al encontrado por otros autores (Solano-Gallego, 2006b; Tabar, 2008). Estas diferencias en los resultados podrían explicarse por diferencias en la población analizada o en la propia técnica de PCR utilizada. El empleo de esta técnica a partir de cultivos de muestras de sangre podría aumentar la sensibilidad de esta técnica (Pons, 2005). En cualquier caso, en nuestra opinión, los resultados de PCR deberían confirmarse con la posterior secuenciación de la banda amplificada, para descartar la posible existencia de amplificaciones inespecíficas.

Todos los animales molecularmente positivos a *Bartonella* spp. eran a su vez seropositivos a *B. henselae*. Otros trabajos han demostrado una asociación entre la prevalencia empleando técnicas moleculares y la seroprevalencia frente a estos agentes (Fabbi, 2004; Pons, 2005). En uno de estos gatos molecularmente positivos, el agente amplificado mostraba una elevada similitud con *B. clarridgeiae* y, sin embargo, era serológicamente positivo frente a *B. henselae*, de lo que podemos deducir que se puede haber producido una reacción serológica cruzada entre estos dos agentes en la técnica de IFI, ya que, además, era serológicamente positivo a un título igual al punto de corte. No obstante, no podemos descartar que se trate de una coinfección con esos dos agentes, como ha sido observado por otros autores (Gurfield, 1997).

En nuestro estudio no hemos encontrado una influencia del **sexo** o el **hábitat** del animal en la seropositividad a *B. henselae*, al igual que otros autores (Fabbi, 2004; Pons, 2005). En lo referente a la **edad**, hemos encontrado una mayor seroprevalencia frente a este agente a mayor edad del animal. Este dato, de nuevo, sería esperable, dado que a mayor edad hay más probabilidad de contacto con su vector. Algunos autores, en estudios serológicos o de bacteriemia, no encuentran asociación con esta variable (Fabbi, 2004;

Pons, 2005; Ferres, 2005; Solano-Gallego, 2006b). Sin embargo, tanto Fabbi y colaboradores como Pons y colaboradores observan que los gatos mayores de un año presentan una mayor seroprevalencia que los gatos más jóvenes (Fabbi, 2004; Pons, 2005). Este hecho puede tener importancia para la salud pública ya que algunos autores señalan que la probabilidad de infección del humano a partir del gato es mayor si el gato es cachorro o menor de un año (Dalton, 1995).

La detección de un mayor porcentaje de seropositivos a *B. henselae* en gatos que están **castrados** es un resultado de difícil interpretación y podría no tener una significación clínica.

En cuanto a la **procedencia**, varios estudios afirman que los gatos considerados como callejeros son con más probabilidad serorreactivos y bacteriémicos que los domésticos en una misma región (Childs, 1994, 1995; Chomel, 1995, 1996a; Ferres, 2005). Sería lógico pensar que los gatos callejeros presentan con mayor frecuencia un contacto con pulgas que los domésticos. Además, tal y como afirman Foley y colaboradores, los valores elevados de seroprevalencia en gateras (con elevado número de gatos) se encuentran asociados con una elevada infestación de pulgas (Foley, 1998). Sin embargo, en nuestro estudio no hemos encontrado ninguna diferencia estadística entre nuestra población de gatos callejeros y de clínicas, por lo que no podemos considerar a los gatos callejeros como más expuestos.

No obstante, en nuestro estudio hemos encontrado una asociación estadística con la presencia de **pulgas**, de manera que un mayor porcentaje de animales seropositivos a este agente presentaban estos ectoparásitos. Este resultado coincidiría con la hipótesis de que *B. henselae* se transmite a través de pulgas (Chomel, 1996a; Foil, 1998; Kelly, 2005; Lappin, 2006; Just, 2008). Además, en el área donde vivimos, el centro de España, no es infrecuente encontrar infestación por pulgas en los animales, dado que el clima es bastante favorable a estos ectoparásitos. Otros autores no encuentran una asociación entre la seropositividad a este agente y la presencia de ectoparásitos (Fabbi, 2004; Pons, 2005). En perros se ha observado que la exposición a pulgas también podría ser un factor de riesgo para la infección por *Bartonella* spp. (Pappalardo, 1997).

Aunque otros autores han detectado *Bartonella* spp. en otros vectores distintos a las pulgas, como son las garrapatas (Hofmeister, 1998; Schouls, 1999; Chang, 2001, 2002; Morozova, 2004), nuestro estudio no ha mostrado asociación entre la seropositividad frente a este agente y el contacto con este último vector.

También hemos encontrado una asociación entre la seropositividad a *B. henselae* y el hecho de haber **viajado** fuera de Madrid. Analizando los lugares donde han viajado estos animales, observamos que los viajes se han realizado a zonas muy variadas de España y a otros países, como Francia y Estados Unidos. Este dato es difícil de interpretar, ante la ausencia de datos de seroprevalencia de la mayoría de las zonas a las que han viajado los gatos.

En cuanto a la influencia de la infección por virus inmunosupresores (**FeLV** y **FIV**), algunos estudios señalan que la incidencia de linfadenopatía y gingivitis aumenta en gatos coinfectados con estos virus (Ueno, 1996). En nuestro estudio no hemos encontrado una asociación entre estas virosis y la seropositividad a *B. henselae*, al igual que han observado otros autores (Solano-Gallego, 2006b), si bien, el papel de estos virus, a nuestro parecer, está aún por aclarar.

Por otro lado, no hemos encontrado asociación con la sintomatología clínica, salvo con **otro tipo de signos clínicos** diferentes a los generales, digestivos, cardiorrespiratorios, oculares, renales, locomotores o neurológicos. Al analizar los signos clínicos tipo “otros” en los animales seropositivos a *Bartonella* spp., se observa que existen bastantes casos que han acudido al veterinario por problemas reproductivos, dermatológicos o bucales. A pesar de que la mayoría de los casos de infección por *Bartonella* spp. en gatos son asintomáticos (Koehler, 1994; Regnery, 1996; Brunt, 2006), se han descrito síntomas clínicos variados, como hemos comentado con anterioridad, entre los que se incluyen los problemas bucales, como la gingivitis y estomatitis, y fallos reproductivos (Glaus, 1997; Guptil, 1998). En función de nuestros resultados, nos parece apropiado señalar que en los gatos de nuestro estudio la infección por *Bartonella* spp. no parece producir sintomatología clínica relevante, si bien la presencia de algunos signos clínicos, como los bucales o los reproductivos, podrían relacionarse con la infección por este agente. Otros estudios similares no observan asociación con ningún tipo de signos clínicos en gatos (Fabbi, 2004; Solano-Gallego, 2006b).

En cuanto a las alteraciones en la analítica sanguínea, algunos autores que han realizado un estudio de prevalencia en gatos sanos y gatos con **anemia** no encuentran diferencias entre ambos grupos (Ishak, 2007). En la misma línea, en nuestro trabajo no encontramos asociación de la seropositividad con el padecimiento de una anemia.

Sin embargo, hemos observado una asociación con la **ausencia de leucocitosis**. En la bibliografía se han descrito escasas alteraciones en la analítica en gatos con *Bartonella* spp., si bien hay casos descritos de anemia y eosinofilia transitoria (Kordik, 1999b), así como, al contrario de lo que hemos observado nosotros, de neutrofilia (Guptil, 1997). La presencia de unos valores de leucocitos normales o bajos en los gatos seropositivos de nuestro estudio podría deberse a *Bartonella* spp., siguiendo la dinámica de las otras infecciones que hemos descrito en el presente trabajo, si bien serían necesarios más estudios para aclarar este descenso del recuento de leucocitos.

Por otro lado, hemos observado que un mayor porcentaje de animales seropositivos a este agente presenta un rango de **proteínas totales** elevado. Esta hiperproteinemia, no descrita previamente en gatos, podría relacionarse con una respuesta del sistema inmunitario ante la estimulación antigénica crónica que *Bartonella* spp. puede causar.

El valor promedio de **glucosa** fue menor en gatos seropositivos a este agente, si bien ambas poblaciones presentaban un valor de glucosa dentro del rango fisiológico. También observamos un rango promedio de **creatinina** mayor en los seropositivos a *B. henselae*, lo que cabría esperar si tenemos en cuenta que este agente podría producir problemas renales en los gatos (Glaus, 1997).

En los **árboles de decisión** y mediante el cálculo del *Odd's ratio* observamos que el porcentaje de seropositividad frente a *B. henselae* es marcadamente más elevado (41,7%) y la probabilidad de que un gato sea seropositivo frente a este agente es 2,44 veces mayor cuando presenta un rango de leucocitos no elevado y cuando el animal presenta pulgas. Estos factores ya se asociaban de modo individual con la seropositividad a este agente, por lo que no es extraño que con la combinación de ambos se confirme esta asociación.

Con todo lo señalado en este apartado, podemos concluir que los gatos del centro de España están **expuestos** a *Bartonella* spp. La importancia de este agente viene marcada por su carácter zoonótico, pudiendo producir enfermedad en el hombre. *B. henselae* es causante de la enfermedad del arañazo del gato o “catch-scratch disease”, siendo el gato el reservorio de este agente para el hombre (Regnery, 1992a; Koehler, 1994). Por tanto, existe el riesgo de transmisión a partir de arañazos o mordeduras de gatos de nuestro entorno.

Sería interesante realizar un estudio en las pulgas del entorno por la posible detección de *Bartonella* spp., lo que afianzaría más el hecho de que el gato es un reservorio de este agente. Igualmente, consideramos interesante realizar cultivos a partir de sangre de los gatos para valorar la bacteriemia por otras técnicas diagnósticas directas diferentes de las moleculares.

6.1.6 Seropositividad a más de un agente

Un $9,9 \pm 1,1\%$ de los animales (n=67) son **seropositivos** a más de un agente al mismo tiempo, con lo que podemos afirmar que existe posibilidad de que haya **conurrencias** entre estas infecciones en el gato.

Existen otros estudios en gatos que también encuentran coinfecciones entre las especies ehrlichiales (*E. canis*, *A. phagocytophilum* y *N. risticii*) y otros agentes, como *Bartonella* spp., *Hepatozoon* spp., *B. burgdorferi*, o los virus de la leucemia e inmunodeficiencia felinas (Charpentier, 1986; Bouloy, 1994; Beaufils, 1997, 1999; Stubbs, 1998, 2000; Foley, 2003; Aguirre, 2004a; Magnarelli, 2005; Solano-Gallego, 2006b). Algunos autores afirman que cuando un animal es positivo a un agente ehrlichial y no responde al tratamiento recomendado, sería necesaria la búsqueda de otras enfermedades concurrentes (Beaufils, 1999), las cuales podrían producir síntomas similares a los provocados por estos agentes, confundiéndonos en el diagnóstico; además, tal y como como afirman otros autores, una enfermedad concurrente podría atenuar el sistema inmunitario del animal, quedando más predispuesto a la infección por otro agente, como los incluidos en el presente estudio (Foley, 2003).

En líneas generales, la existencia de seropositividad frente a dos o más agentes diferentes en un mismo animal puede ser debida tanto a una **coinfección** por ambos agentes como a una **reacción cruzada** entre ellos.

A la hora de valorar la presencia de asociaciones concretas entre los cinco agentes incluidos en el estudio, encontramos una asociación estadísticamente significativa entre la seropositividad a *E. canis* y *A. phagocytophilum* en los gatos de nuestro estudio. La posibilidad de reacción cruzada entre estos dos agentes ha sido descrita previamente en la especie canina, especialmente cuando el título de anticuerpos frente a uno de los agentes es muy elevado (Waner, 2001). En infecciones experimentales con *E. canis*, se ha constatado esta reacción cruzada, si bien solamente se produce cuando han pasado más de 150 días post-infección (Harrus, 1998c; Waner, 2001b).

Sin embargo, en nuestro estudio, observamos que 54 de nuestros gatos son seropositivos a *E. canis* pero no a *A. phagocytophilum*, mientras que 44 lo son sólo a *A. phagocytophilum*, pero no a *E. canis*, habiendo tan sólo 13 gatos que son seropositivos a los dos agentes, los cuales, además presentan títulos bajos. Estos resultados indican que la posibilidad de reacción cruzada entre ambos agentes en muchos de los gatos de nuestro estudio es inexistente, por lo que la hipótesis de la coinfección es más probable.

Estudios previos han observado esta posibilidad de infección simultánea entre *E. canis* y *A. phagocytophilum* en gatos en España (Aguirre, 2004a; Solano-Gallego, 2006b). Estas especies se podrían transmitir a un mismo animal por medio de garrapatas, ya que ambos agentes se transmiten por dicho vector. Sin embargo, las especies de garrapatas transmisoras son diferentes, siendo *R. sanguineus* el vector de *E. canis* (Groves, 1975; Smith, 1976; Lewis, 1977) e *Ixodes* spp. el de *A. phagocytophilum* (Parola, 1998).

Ixodes spp. está localizada más al norte de nuestro país, siendo menor su descripción en nuestra Comunidad (Estrada-Peña, 1994). Además, existe la posibilidad de reacción cruzada entre *A. phagocytophilum* y *A. platys*, especie que se cree que se transmite por la misma garrapata que *E. canis*, *R. sanguineus* (Hibler, 1986). Por todo ello, y al igual que se ha observado en perros (Kordick, 1999; Sainz, 1999; Hua, 2000), tendría

más lógica que los gatos seropositivos a *E. canis* y *A. phagocytophilum* de nuestro estudio hayan tenido contacto en realidad con *E. canis* y *A. platys*.

Además, hemos encontrado una asociación entre la seropositividad a *E. canis* y a *N. risticii*, observándose que de los 7 animales seropositivos a *N. risticii*, 4 lo son también a *E. canis*. En cualquier caso, hay que tener en cuenta el bajo número de animales seropositivos a *N. risticii*, que nos podría interferir en los resultados. Además, los 4 animales seropositivos a los dos agentes presentaban un título bajo frente a ambos. Estos dos agentes han mostrado algún tipo de reacción serológica cruzada en perros (Vemulapalli, 1998), si bien algunos concluyen que dicha relación serológica es mínima (Shankarappa, 1992). Previamente, también se ha referido la existencia de perros y gatos seropositivos a ambos agentes en nuestro país (Aguirre, 2004b; Amusatogui, 2008); no obstante, los escasos datos referidos a la detección molecular de *N. risticii* fuera de Norteamérica nos hacen pensar que probablemente los gatos seropositivos a esta rickettsia puedan estar mostrando una reacción serológica frente a otro agente próximo, como puede ser *E. canis*.

Por otro lado, hemos encontrado una asociación entre la seropositividad a *E. canis* y *B. henselae* y entre *A. phagocytophilum* y *B. henselae*. Hasta el momento, no se ha descrito la existencia de reacciones cruzadas entre *Bartonella* spp. y *Anaplasma* spp. Sin embargo, se ha observado la posibilidad de reacción cruzada entre *Bartonella* spp. y *Ehrlichia chaffeensis* (McGill, 1998), lo que podría explicar la asociación encontrada en este sentido en nuestro estudio. En cualquier caso, también se ha observado coinfección entre *Ehrlichia* spp. y *Bartonella* spp. en perros (Kordick, 1999) por lo que no podemos descartar esta posibilidad en los gatos de nuestro estudio. Se considera que *Ehrlichia/Anaplasma* spp. y *Bartonella* spp. se transmiten por vectores diferentes (garrapatas y pulgas, respectivamente). No obstante, aunque *Ehrlichia/Anaplasma* spp. no parecen transmitirse por medio de pulgas (Lappin, 2006), sí se ha detectado ADN de *Bartonella* spp. en garrapatas, fundamentalmente del género *Ixodes* (Hofmeister, 1998; Schouls, 1999; Chang, 2001, 2002; Sanogo, 2003; Morozova, 2004), si bien su capacidad vectorial para la transmisión de este agente está aún por aclarar.

A pesar de que en nuestro entorno, en el caso del perro, son más frecuentes las concurrencias entre **ehrlichiosis** y **leishmaniosis** (Tesouro, 1993; Sainz, 1996b), en

nuestro estudio en gatos tan sólo hay 5 animales que presentan anticuerpos frente a estos dos agentes, y a títulos bajos, sin que hayamos encontrado asociación estadística entre ambas seropositividades. El hecho de que no encontremos asociación estadística entre la seropositividad a *L. infantum* y el resto de agentes indica no sólo una baja incidencia de coinfección en gatos parasitados por *Leishmania* spp. sino que también sugiere la ausencia de reacciones cruzadas entre *L. infantum* y dichos agentes.

Por último, hemos querido analizar la posible asociación de la seropositividad a más de un agente (independientemente de cuál fuera) con las diferentes variables incluidas en el estudio. En este sentido, hemos observado que las concurrencias se producen con mayor probabilidad en los animales de **otras razas** diferentes al Común Europeo, lo que podría explicarse por el hecho de que las razas más selectas pueden ser más susceptibles a determinadas infecciones (Macieira, 2008).

Además, observamos una influencia de la **edad**, siendo los gatos geriátricos los más predispuestos a ser seropositivos a más de un agente. De nuevo, éste es un dato esperable ya que, como hemos comentado con anterioridad, la probabilidad de que el animal esté expuesto a varios vectores distintos será mayor cuanto mayor sea la edad del animal.

Bajo nuestro punto de vista, un hecho muy llamativo es la asociación entre la seropositividad a más de un agente con la presencia de **garrapatas**. Conocemos el papel que poseen estos vectores para la transmisión de algunos de los agentes de nuestro estudio en perros (Groves, 1975; Smith, 1976; Lewis, 1977; Magnarelli, 1995; Johnson, 1998; Reubel, 1998b; Cohn, 2003), por lo que cabe la posibilidad de que su papel sea similar en la especie felina. También es posible que la presencia de garrapatas en gatos, a su vez, nos esté indicando la existencia de unas condiciones higiénico-sanitarias deficientes.

La existencia de asociación estadística entre la presencia de anticuerpos frente a más de un agente y la ausencia de **enfermedades concurrentes** como FeLV, FIV o PIF incidiría en la hipótesis de que los gatos se infectan habitualmente por estos agentes sin necesidad de que padezcan previamente estas virosis (Poli, 2002). Probablemente, la excepción al respecto sería *L. infantum*, que, como hemos comentado previamente, sí se asocia con la presencia del virus de la inmunodeficiencia felina (FIV).

Parece lógico que también se encuentre asociación entre la seropositividad a más de un agente con **otro** tipo de síntomas clínicos, ya que son varios los agentes en los que, de modo individual, también se encuentra esta asociación. Algo similar ocurre con la elevación del **hematocrito**, de las **proteínas totales** y de la **creatinina** en los gatos seropositivos a múltiples agentes de nuestro trabajo, ya que éste es un hallazgo encontrado en muchas ocasiones en las ehrlichiosis, anaplasmosis y leishmaniosis felinas (Buoro, 1989; Bouloy, 1994; Beaufils, 1995, 1997; Stubbs, 1998, 2000; Pennissi, 2002, 2004; Aguirre, 2004a; Tarello, 2005).

En resumen, podemos afirmar que los gatos de la zona centro de España están expuestos a *E. canis*, *A. phagocytophilum*, *N. risticii*, *L. infantum* y *B. henselae* u otras especies cercanas, siendo además posible la infección conjunta por varios de estos agentes en el mismo animal.

7 CONCLUSIONES

1. Los gatos de la Comunidad de Madrid procedentes tanto de clínicas veterinarias como de la calle presentan serorreactividad frente a *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Neorickettsia risticii*, *Leishmania infantum* y *Bartonella henselae*.
2. Se estima que el $9,9 \pm 1,1\%$ de los gatos de nuestro entorno son seropositivos a *Ehrlichia canis*. La detección de anticuerpos frente a este agente es mayor en animales de mayor edad, en casos controlados durante los meses de mayo y noviembre así como en aquellos gatos que no han salido al exterior. El contacto con este agente no se asocia con ningún tipo de signos clínicos, pero sí con alteraciones biopatológicas, como un incremento en los valores de hematocrito, proteínas totales y creatinina.
3. Un $8,4 \pm 1,1\%$ de los gatos de la Comunidad de Madrid son seropositivos a *Anaplasma phagocytophilum*, siendo su detección más habitual cuando la muestra se recoge en otoño, así como en animales que proceden de clínicas o que no salen al exterior de la vivienda. En relación con el cuadro clínico, la seropositividad a *Anaplasma phagocytophilum* se asocia con la presentación de signos locomotores.
4. La prevalencia frente a *Neorickettsia risticii* en nuestro entorno es muy reducida ($1 \pm 0,4\%$), siendo la seropositividad mayor en hembras. En todo caso, los títulos de anticuerpos encontrados en gatos de la Comunidad de Madrid son bajos.
5. No existe evidencia molecular de infección por *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. y *Neorickettsia* spp. en los gatos de la Comunidad de Madrid. Estos agentes tampoco se han aislado en líneas celulares específicas, si bien la detección de inclusiones intracitoplasmáticas compatibles con estas infecciones, tanto en frotis sanguíneos como en algunos de los cultivos, no permiten descartar por completo su existencia.
6. Se confirma mediante métodos moleculares la existencia de gatos parasitados por *Leishmania infantum* en la Comunidad de Madrid. La seropositividad ($3,7 \pm 0,7\%$) es inferior a la encontrada en perros del mismo entorno. La detección de anticuerpos frente a este agente es más habitual en gatos de mayor edad así como

en animales positivos al virus de la inmunodeficiencia felina. Los gatos seropositivos tienden a presentar signos clínicos variados, en especial, gingivoestomatitis y cuadros de tipo cutáneo. Las alteraciones analíticas asociadas con la seropositividad a *Leishmania infantum* en gatos son una linfocitosis relativa y un incremento en la ALT.

7. Se confirma la presencia de *Bartonella henselae* y de *Bartonella clarridgeiae* en gatos de la Comunidad de Madrid. En comparación con la seroprevalencia frente a *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Neorickettsia risticii* y *Leishmania infantum*, la prevalencia estimada frente a *Bartonella henselae* es la más elevada de todas las evaluadas ($23,8 \pm 1,6\%$). La detección de anticuerpos es mayor en animales de edad más avanzada así como en aquellos que han sido castrados. Las variables ambientales asociadas a la seropositividad frente a *Bartonella henselae* apoyan la hipótesis de la transmisión por pulgas de este agente. Los gatos seropositivos tienden a presentar un incremento en los valores de proteínas totales y de creatinina. Por el contrario, la concentración de leucocitos y de glucosa es menor en los animales seropositivos.
8. La exposición a más de uno de los agentes estudiados en gatos de nuestro entorno es considerable, estimándose que el $9,9 \pm 1,1\%$ de la población es seropositiva a más de uno de ellos, encontrándose asociaciones entre la positividad a *Ehrlichia canis* y *Anaplasma phagocytophilum*, a *Ehrlichia canis* y *Neorickettsia risticii*, a *Ehrlichia canis* y *Bartonella henselae* y a *Anaplasma phagocytophilum* y *Bartonella henselae*. *Leishmania infantum* es el único de los agentes estudiados que no se relaciona serológicamente con el resto.

8 RESUMEN

En el presente trabajo se ha realizado un estudio sobre la presencia de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Neorickettsia* spp., *Leishmania* spp. y *Bartonella* spp. en 680 gatos de la Comunidad de Madrid, procedentes tanto de clínicas veterinarias como de la calle. En estos animales se analizó la presencia de estos agentes, utilizando métodos serológicos (concretamente, la inmunofluorescencia indirecta), moleculares (empleando la reacción en cadena de la polimerasa) y cultivos celulares (empleando líneas celulares específicas). Además, en todos los casos, se recopilaron datos sobre la reseña, el entorno, la sintomatología clínica y los hallazgos laboratoriales.

Según los resultados obtenidos, un 9,9% de los gatos son seropositivos a *E. canis*, un 8,4% a *A. phagocytophilum*, un 1% a *N. risticii*, un 3,7% a *L. infantum* y un 23,8% a *B. henselae*. Además, un 9,9% de ellos son seropositivos a más de un agente simultáneamente.

En cuanto al estudio molecular, se ha detectado la presencia de algunos de estos agentes en la sangre de los gatos estudiados, como *Leishmania* spp. o *Bartonella* spp. A este respecto, se ha conseguido amplificar ADN de *L. infantum* en cuatro gatos, de *B. henselae* en un caso y de *B. clarridgeiae* en otro animal, siendo éstas las primeras descripciones de estos agentes en gatos de la zona centro de España.

No se ha obtenido amplificación alguna, empleando métodos moleculares a partir de cultivos de sangre en las líneas celulares DH82, HL60 y P388D1, si bien se han observado imágenes compatibles con la infección por *Ehrlichia* spp. en la línea DH82 en dos gatos, y de *Anaplasma* spp. en la línea celular HL60 en otros dos gatos diferentes.

El estudio estadístico de los datos muestra que la seropositividad a cada uno de los agentes estudiados se asocia a múltiples variables, tanto ambientales como clínicas y analíticas, lo que puede ser de utilidad en el intento de caracterizar estas infecciones en la especie felina.

9 SUMMARY

In the present work, the presence of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Neorickettsia* spp., *Leishmania* spp. and *Bartonella* spp. was evaluated in 680 domestic or stray cats from Madrid, Spain. For that purpose, serological (immunofluorescent antibody test), molecular (polymerase chain reaction) and culture in specific cell lines methods were used. Besides, some data were taken from each cat, relating to signalment, environmental factors and clinical and laboratory findings.

Our results show seroreactivity to *E. canis* in 9,9% of the cats, to *A. phagocytophilum* in 8,4%, to *N. risticii* in 1%, to *L. infantum* in 3,7% and to *B. henselae* in 23,8% of the feline population. Besides, 9,9% of the cats showed antibody reactivity to more than one agent.

Through the molecular study, some of these agents were detected in the blood of these cats. Thus, *L. infantum* DNA was amplified in four cats, *B. henselae* DNA in one cat, and *B. clarridgeiae* DNA in another one. These results show for the first time amplifications of these agents in cats from Central Spain.

Amplification of DNA was not obtained from the supernatant of blood cultures in cell lines DH82, HL60 and P388D1. However, some inclusion bodies compatible with *Ehrlichia* spp. were detected in two cases in DH82 cell line, and other inclusions compatible with *Anaplasma* spp. were observed in HL60 cell line in another two cases.

Statistical analysis shows that seropositivity of these agents is associated with different environmental, clinical and laboratory factors, that can be useful in order to characterize the role of cats in these infections.

10 BIBLIOGRAFIA

- Abbott, R. C., B. B. Chomel, et al. (1997). "Experimental and natural infection with *Bartonella henselae* in domestic cats." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **20**(1): 41-51.
- Abeygunawardena, I., I. Kakoma, et al. (1990). "Pathophysiology of canine ehrlichiosis." *Ehrlichiosis*. Netherlands, Kluwer Academic Publishers: pp. 79-92.
- Abranches, P., M. C. Silva-Pereira, et al. (1991a). "Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection." *J Parasitol* **77**(4): 557-61.
- Abranches, P., G. Santos-Gomes, et al. (1991b). "An experimental model for canine visceral leishmaniasis." *Parasite Immunol* **13**(5): 537-50.
- Agan, B. K., M. J. Dolan (2002). "Laboratory diagnosis of *Bartonella* infections." *Clin Lab Med* **22**(4): 937-62.
- Aguero-Rosenfeld, M. E., H. W. Horowitz, et al. (1996). "Human granulocytic ehrlichiosis: a case series from a medical center in New York State." *Ann Intern Med* **125**(11): 904-8.
- Aguiló, J. (1994). "Mesa redonda sobre la situación actual de la leishmaniosis canina." *AMVAC*. Madrid.
- Aguirre, E., M. A. Tesouro, et al. (2004a). "Assessment of feline ehrlichiosis in central Spain using serology and a polymerase chain reaction technique." *Ann N Y Acad Sci* **1026**: 103-5.
- Aguirre, E., A. Sainz, et al. (2004b). "First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain." *Vet Parasitol* **125**(3-4): 365-72.
- Aguirre, E., M. A. Tesouro, et al. (2006). "Genetic characterization of *Anaplasma* (*Ehrlichia*) *platys* in dogs in Spain." *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **53**(4): 197-200.
- Aguirre, E., T. Ayllón, et al. (2008). "Results from an indirect fluorescent antibody test using three different strains of *Ehrlichia canis*." In Press.
- Agut, A., N. Corzo, et al. (2003). "Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs with leishmaniasis." *Vet Rec* **153**(21): 648-52.
- Aisa, M. J., S. Castillejo, et al. (1998). "Diagnostic potential of Western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern." *Am J Trop Med Hyg* **58**(2): 154-9.
- Alberdi, M. P., A. R. Walker, et al. (1998). "Natural prevalence of infection with *Ehrlichia* (*Cytoecetes*) phagocytophila of *Ixodes ricinus* ticks in Scotland." *Vet Parasitol* **78**(3): 203-13.
- Alberti, A. and O. A. Sparagano (2006). "Molecular diagnosis of granulocytic anaplasmosis and infectious cyclic thrombocytopenia by PCR-RFLP." *Ann N Y Acad Sci* **1081**: 371-8.
- Alexander, B., M. Maroli (2003). "Control of phlebotomine sandflies." *Medical and Veterinary Entomology*, **17**, 1-18.
- Almosny, N. R. P. and Massard, C. L. (1999). "Feline ehrlichiosis. Review." *Rev Clin Vet* **4**: 30-32.
- Alvar, J., Ortiz, M. (1987). "Caracterización isoenzimática de cepas de *Leishmania* aisladas en la provincia de Madrid." *Rev Ibér Parasitol Volumen extraordinario*: 45-50.
- Alvar, J., R. Molina, et al. (1994). "Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy." *Ann Trop Med Parasitol* **88**(4): 371-8.
- Alvar, J., C. Canavate, et al. (1997). "*Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years." *Clin Microbiol Rev* **10**(2): 298-319.
- Amerein, M. P., D. De Briel, et al. (1996). "Diagnostic value of the indirect immunofluorescence assay in cat scratch disease with *Bartonella henselae* and *Afpia felis* antigens." *Clin Diagn Lab Immunol* **3**(2): 200-4.
- Amusategui, I., A. Sainz, et al. (1995a). "Tratamiento de la leishmaniosis canina. Parte I." *Med Vet* **12**(5): 289-98.
- Amusategui, I., A. Sainz, et al. (1995b). "Tratamiento de la leishmaniosis canina. Parte II." *Med Vet* **12**(6): 373-83.
- Amusategui, I., A. Sainz, et al. (1998). "Effects of antimonial therapy for canine leishmaniasis on antibody titer." *Ann N Y Acad Sci* **849**: 444-6.
- Amusategui, I. (1999). "Tratamiento de la leishmaniosis canina: valoración, caracterización y comparación de la respuesta a distintos protocolos a base de antimonio de meglumine (asociado o no a alopurinol) (tesis doctoral)." León, España, Universidad de León.
- Amusategui, I., A. Sainz, et al. (2003). "Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis." *Eur J Epidemiol* **18**(2): 147-56.
- Amusategui, I., M. A. Tesouro, et al. (2008). "Serological Reactivity to *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Neorickettsia risticii*, *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia conorii* in Dogs from Northwestern Spain." *Vector Borne Zoonotic Dis* **8**(6): 797-803.
- Anderson, B. E., J. E. Dawson, et al. (1991). "*Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis." *J Clin Microbiol* **29**(12): 2838-42.
- Anderson, B. E., C. E. Greene, et al. (1992). "*Ehrlichia ewingii* sp. nov., the etiologic agent of canine granulocytic ehrlichiosis." *Int J Syst Bacteriol* **42**(2): 299-302.
- Anderson, B., K. Sims, et al. (1994). "Detection of *Rochalimaea henselae* DNA in specimens from cat scratch disease patients by PCR." *J Clin Microbiol* **32**(4): 942-8.

- Anderson, B. E. and M. A. Neuman (1997). "Bartonella spp. as emerging human pathogens." *Clin Microbiol Rev* **10**(2): 203-19.
- Anziani, O. S., S. A. Ewing, et al. (1990). "Experimental transmission of a granulocytic form of the tribe Ehrlichieae by *Dermacentor variabilis* and *Amblyomma americanum* to dogs." *Am J Vet Res* **51**(6): 929-31.
- Arboix, M. (1997). "Terapèutica de la leishmaniosis canina." *Canis et felis*, **29**: 65-81
- Arguin, P. M., J. Singleton, et al. (1999). "An investigation into the possibility of transmission of tick-borne pathogens via blood transfusion. Transfusion-Associated Tick-Borne Illness Task Force." *Transfusion* **39**(8): 828-33.
- Arias, J. R., P. S. Monteiro, et al. (1996). "The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil." *Emerg Infect Dis* **2**(2): 145-6.
- Arraga-Alvarado, C., M. Montero-Ojeda, et al. (1996). "[Human ehrlichiosis: report of the 1st case in Venezuela]." *Invest Clin* **37**(1): 35-49.
- Arraga-Alvarado, C., M. Palmar, et al. (1999). "Fine structural characterisation of a Rickettsia-like organism in human platelets from patients with symptoms of ehrlichiosis." *J Med Microbiol* **48**(11): 991-7.
- Arraga-Alvarado, C., M. Palmar, et al. (2003). "Ehrlichia platys (Anaplasma platys) in dogs from Maracaibo, Venezuela: an ultrastructural study of experimental and natural infections." *Vet Pathol* **40**(2): 149-56.
- Arthur, D. R. (1956). "Ticks and disease." En: *International Series of Monographs on Pure and Applied Biology*. Division Zoology, vol 9. Pergamon Press Ltd., Londres, p. 437.
- Arvand, M. and S. G. Schad (2006). "Isolation of Bartonella henselae DNA from the peripheral blood of a patient with cat scratch disease up to 4 months after the cat scratch injury." *J Clin Microbiol* **44**(6): 2288-90.
- Arvand, M., J. Viezens, et al. (2008). "Prolonged Bartonella henselae bacteremia caused by reinfection in cats." *Emerg Infect Dis* **14**(1): 152-4.
- Ashford, D. A., M. Bozza, et al. (1995). "Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis." *Am J Trop Med Hyg* **53**(3): 251-5.
- Ashford, R. W. (2000). "The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses." *Int J Parasitol* **30**(12-13): 1269-81.
- Athias, A. (1991). "Parasitología clínica." Santiago de Chile, Publicaciones Técnicas Mediterráneo, pp. 248-254.
- Avidor, B., M. Graidy, et al. (2004). "Bartonella koehlerae, a new cat-associated agent of culture-negative human endocarditis." *J Clin Microbiol* **42**(8): 3462-8.
- Ayala, I, T. Talone, et al. (1998). "El síndrome de inmunodeficiencia adquirida del gato causado por el F.I.V. (Feline Immunodeficiency virus)." *Arch Med Vet* **30**(1): 5-12.
- Ayllón, T., M. A. Tesouro, et al. (2008). "Serologic and molecular evaluation of Leishmania infantum in cats from central Spain." *Ann N Y Acad Sci* **1149**: 361-4.
- Bacellar, F., J. E. Dawson, et al. (1995). "Antibodies against Rickettsiaceae in dogs of Setubal, Portugal." *Cent Eur J Public Health* **3**(2): 100-2.
- Baker, D. C., S. D. Gaunt, et al. (1988). "Anemia of inflammation in dogs infected with Ehrlichia platys." *Am J Vet Res* **49**(7): 1014-6.
- Bakken, J. S., J. S. Dumler, et al. (1994). "Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. A new species emerging?" *Jama* **272**(3): 212-8.
- Bakken, J. S., J. Krueth, et al. (1996). "Serological evidence of human granulocytic ehrlichiosis in Norway." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **15**(10): 829-32.
- Baneth, G., D. L. Kordick, et al. (1996). "Comparative seroreactivity to Bartonella henselae and Bartonella quintana among cats from Israel and North Carolina." *Vet Microbiol* **50**(1-2): 95-103.
- Baneth, G. and S. E. Shaw (2002). "Chemotherapy of canine leishmaniasis." *Vet Parasitol* **106**(4): 315-24.
- Baneth, G. (2006). *Leishmaniasis*. In: *Infectious Diseases of the Dog and Cat* (3rd Edition). Greene, C. E. (ed.). Saunders.
- Barber, R. D., D. W. Harmer, et al. (2005). "GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues." *Physiol Genomics* **21**: 389-95.
- Barbieri, C. L. (2006). "Immunology of canine leishmaniasis." *Parasite Immunol* **28**(7): 329-37.
- Barlough, J. E., Y. Rikihisa, et al. (1997). "Nested polymerase chain reaction for detection of Ehrlichia risticii genomic DNA in infected horses." *Vet Parasitol* **68**(4): 367-73.
- Barlough, J. E., G. H. Reubel, et al. (1998). "Detection of Ehrlichia risticii, the agent of Potomac horse fever, in freshwater stream snails (Pleuroceridae: Juga spp.) from northern California." *Appl Environ Microbiol* **64**(8): 2888-93.
- Barnes, J. C., O. Stanley, et al. (1993). "Diffuse cutaneous leishmaniasis in a cat." *J Am Vet Med Assoc* **202**(3): 416-8.
- Bartsch, R. C. and R. T. Greene (1996). "Post-therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and/or doxycycline." *J Vet Intern Med* **10**(4): 271-4.
- Bass, J. W., J. M. Vincent, et al. (1997). "The expanding spectrum of Bartonella infections: I. Bartonellosis and trench fever." *Pediatr Infect Dis J* **16**(1): 2-10.
- Baumgarten, B. U., M. Rollinghoff, et al. (1999). "Prevalence of Borrelia burgdorferi and granulocytic and monocytic ehrlichiae in Ixodes ricinus ticks from southern Germany." *J Clin Microbiol* **37**(11): 3448-51.
- Beall, M. J., R. Chandrashekar, et al. (2008). "Serological and molecular prevalence of Borrelia burgdorferi, Anaplasma phagocytophilum, and Ehrlichia species in dogs from Minnesota." *Vector Borne Zoonotic Dis* **8**(4): 455-64.

- Beaufils, J. P., J. Martin-Granel, et al. (1995). "Infection du chat par une Ehrlichia sp.: à propos de trois cas." *Prat Méd Chir Anim Comp* **30**: 397-402.
- Beaufils, J. P., J. Martin-Granel, et al. (1997). "Ehrlichiose féline: à propos de deux cas." *Bull Acad Vét de France* **70**: 73-80.
- Beaufils, J. P., E. B. Breitschwerdt, et al. (2002). "Ehrlichiose felina: identification genetique de l'agent chez deux chats." *Pract Med Chir Anim Comp* **37**: 235-238.
- Belongia, E. A. (2002). "Epidemiology and impact of coinfections acquired from Ixodes ticks." *Vector Borne Zoonotic Dis* **2**(4): 265-73.
- Bell, C. A. and R. Patel (2005). "A real-time combined polymerase chain reaction assay for the rapid detection and differentiation of *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Ehrlichia ewingii*." *Diagn Microbiol Infect Dis* **53**(4): 301-6.
- Bellah, J. R., R. M. Shull, et al. (1986). "Ehrlichia canis-related polyarthritis in a dog." *J Am Vet Med Assoc* **189**(8): 922-3.
- Beneson, A. S., ed. (1990). "Control of Communicable Disease in Man." Washington, DC, American Public Health Association.
- Beneson, A. S. (1997). "Manual para el control de las enfermedades transmisibles. Decimosexta edición." *Informe Oficial de la Asociación Estadounidense de Salud Pública*. Publicación científica N° 564. Org. Panamericana de la Salud: pp. 96-98.
- Benson, L. A., S. Kar, et al. (1986). "Entry of *Bartonella bacilliformis* into erythrocytes." *Infect Immun* **54**(2): 347-53.
- Bergeaud, P. (1988). "L'apport de la corticothérapie dans le traitement de certaines formes de leishmaniose canine: résultats sur une série de quarante-trois cas." *Prat Méd Chir Anim Comp* **23**: Suppl.5: 121-7.
- Bergeon, M. P. (1927). "Un cas de leishmaniose chez le chat." *Bulletin de la Société de Science Vétérinaire de Lyon* **30**(92-93).
- Bergh, K., L. Bevanger, et al. (2002). "Low prevalence of *Bartonella henselae* infections in Norwegian domestic and feral cats." *Apmis* **110**(4): 309-14.
- Bergmans, A. M., J. F. Schellekens, et al. (1996). "Predominance of two *Bartonella henselae* variants among cat-scratch disease patients in the Netherlands." *J Clin Microbiol* **34**(2): 254-60.
- Bergmans, A. M., C. M. de Jong, et al. (1997). "Prevalence of *Bartonella* species in domestic cats in The Netherlands." *J Clin Microbiol* **35**(9): 2256-61.
- Bermond, D., R. Heller, et al. (2000). "*Bartonella birtlesii* sp. nov., isolated from small mammals (*Apodemus* spp.)." *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 6**: 1973-9.
- Berrahal, F., C. Mary, et al. (1996). "Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting." *Am J Trop Med Hyg* **55**(3): 273-7.
- Billeter, S. A., J. A. Spencer, et al. (2007). "Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in domestic felines in the United States." *Vet Parasitol* **147**(1-2): 194-8.
- Billeter, S. A., M. G. Levy, et al. (2008). "Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission." *Med Vet Entomol* **22**(1): 1-15.
- Birkenheuer, A. J., M. G. Levy, et al. (2003). "Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples." *J Clin Microbiol* **41**(9): 4172-7.
- Birtles, R. J., T. G. Harrison, et al. (1994). "Grahamella in small woodland mammals in the U.K.: isolation, prevalence and host specificity." *Ann Trop Med Parasitol* **88**(3): 317-27.
- Birtles, R. J., T. G. Harrison, et al. (1995). "Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov." *Int J Syst Bacteriol* **45**(1): 1-8.
- Biswas, S., D. Raoult, et al. (2008). "Molecular characterization of resistance to rifampicin in *Bartonella quintana*." *5th International Meeting on Rickettsiae and Rickettsial Diseases*, Marseille, France, ESCMID and ASR.
- Bjoersdorff, A., L. Svendenius, et al. (1999). "Feline granulocytic ehrlichiosis—a report of a new clinical entity and characterisation of the infectious agent." *J Small Anim Pract* **40**(1): 20-4.
- Bjoersdorff, A., S. Bergstrom, et al. (2001). "Ehrlichia-infected ticks on migrating birds." *Emerg Infect Dis* **7**(5): 877-9.
- Bjoersdorff, A., B. Bagert, et al. (2002). "Isolation and characterization of two European strains of *Ehrlichia phagocytophila* of equine origin." *Clin Diagn Lab Immunol* **9**(2): 341-3.
- Blackwell, J. M., T. Goswami, et al. (2001). "SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance." *Cell Microbiol* **3**(12): 773-84.
- Blanco, J. R., J. A. Oteo, et al. (1999). "[Seroepidemiology of *Bartonella henselae* infection in HIV-infected patients]." *Enferm Infecc Microbiol Clin* **17**(9): 434-8.
- Blanco, J. R. and J. A. Oteo (2002). "Human granulocytic ehrlichiosis in Europe." *Clin Microbiol Infect* **8**(12): 763-72.
- Blanco, J. R., D., Raoult (2005). "Enfermedades producidas por *Bartonella* spp." *Enferm Infecc Microbiol Clin* **23**(5): 313-320.
- Blanco, J. R., L. Perez-Martinez, et al. (2006). "Prevalence of rickettsia felis-like and *Bartonella* Spp. in *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* from La Rioja (Northern Spain)." *Ann N Y Acad Sci* **1078**: 270-4.
- Blavier, A., S. Keroack, et al. (2001). "Atypical forms of canine leishmaniasis." *Vet J* **162**(2): 108-20.

- Bonfante-Garrido, R., I. Urdaneta, et al. (1991). "Natural infection of cats with *Leishmania* in Barquisimeto, Venezuela." Trans R Soc Trop Med Hyg **85**(1): 53.
- Bongiorno, G., A. Habluetzel, et al. (2003). "Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy." Acta Trop **88**(2): 109-16.
- Boni, M., B. Davoust, et al. (1997). "Rats et chats errants: enquête épidémiologique en milieu urbain." Bull Soc Vét Prat Fr **81**: 441-57.
- Bool, P. H. and P. Suttmoller (1957). "Ehrlichia canis infections in dogs on Aruba (Netherlands Antilles)." J Am Vet Med Assoc **130**(9): 418-20.
- Bosselut, H. (1948). "Un cas de leishmaniose generale du chat." Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie **26**: 14.
- Botet, J., and M. Portús (1993). "La leishmaniosis en la España peninsular. Revisión histórico-bibliográfica (1912-1985)." Rev San Hig Púb **67**: 255-66.
- Botros, B. A., M. S. Elmolla, et al. (1995). "Canine ehrlichiosis in Egypt: sero-epidemiological survey." Onderstepoort J Vet Res **62**(1): 41-3.
- Boulouis, H. J., C. C. Chang, et al. (2005). "Factors associated with the rapid emergence of zoonotic Bartonella infections." Vet Res **36**(3): 383-410.
- Bouloy, R. P., M. R. Lappin, et al. (1994). "Clinical ehrlichiosis in a cat." J Am Vet Med Assoc **204**(9): 1475-8.
- Bravo, L., L. A. Frank, et al. (1993). "Canine leishmaniasis in the United States." Small Anim Paras **15**(5): 699-708.
- Breitschwerdt, E. B., B. J. Woody, et al. (1987). "Monoclonal gammopathy associated with naturally occurring canine ehrlichiosis." J Vet Intern Med **1**(1): 2-9.
- Breithschwerdt, E. B. (1995a). "The rickettsiosis." En: Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the Dog and Cat. Philadelphia, W. B. Saunders: pp. 376-383.
- Breitschwerdt, E. B., D. L. Kordick, et al. (1995b). "Endocarditis in a dog due to infection with a novel Bartonella subspecies." J Clin Microbiol **33**(1): 154-60.
- Breitschwerdt, E. B., B. C. Hegarty, et al. (1998a). "Doxycycline hyclate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two Ehrlichia canis strains." Antimicrob Agents Chemother **42**(2): 362-8.
- Breitschwerdt, E. B., B. C. Hegarty, et al. (1998b). "Sequential evaluation of dogs naturally infected with Ehrlichia canis, Ehrlichia chaffeensis, Ehrlichia equi, Ehrlichia ewingii, or Bartonella vinsonii." J Clin Microbiol **36**(9): 2645-51.
- Breitschwerdt, E. B. and D. L. Kordick (2000). "Bartonella infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection." Clin Microbiol Rev **13**(3): 428-38.
- Breitschwerdt, E. B. (2001). "Ehrlichiosis: New Developments." WSAVA. World Congress Vancouver.
- Breitschwerdt, E. B., A. C. Abrams-Ogg, et al. (2002). "Molecular evidence supporting Ehrlichia canis-like infection in cats." J Vet Intern Med **16**(6): 642-9.
- Breithschwerdt, E. B. (2003). "anine and feline ehrlichiosis: new developments." 19th Annual Congress of the ESVD-ECVD, Tenerife, Spain.
- Breitschwerdt, E. B., R. G. Maggi, et al. (2007). "Isolation of Bartonella quintana from a woman and a cat following putative bite transmission." J Clin Microbiol **45**(1): 270-2.
- Breitschwerdt, E. B. (2008). "Feline bartonellosis and cat scratch disease." Vet Immunol Immunopathol **123**(1-2): 167-71.
- Brenner, D. J., D. G. Hollis, et al. (1991). "Proposal of Afipia gen. nov., with Afipia felis sp. nov. (formerly the cat scratch disease bacillus), Afipia clevelandensis sp. nov. (formerly the Cleveland Clinic Foundation strain), Afipia broomeae sp. nov., and three unnamed genospecies." J Clin Microbiol **29**(11): 2450-60.
- Brenner, D. J., S. P. O'Connor, et al. (1993). "Proposals to unify the genera Bartonella and Rochalimaea, with descriptions of Bartonella quintana comb. nov., Bartonella vinsonii comb. nov., Bartonella henselae comb. nov., and Bartonella elizabethae comb. nov., and to remove the family Bartonellaceae from the order Rickettsiales." Int J Syst Bacteriol **43**(4): 777-86.
- Brouqui, P., J. S. Dumler, et al. (1995). "Human granulocytic ehrlichiosis in Europe." Lancet **346**(8977): 782-3.
- Brouqui, P., B. Lascola, et al. (1999). "Chronic Bartonella quintana bacteremia in homeless patients." N Engl J Med **340**(3): 184-9.
- Brouqui, P., Y. O. Sanogo, et al. (2003). "Candidatus Ehrlichia walkeri: a new Ehrlichia detected in Ixodes ricinus tick collected from asymptomatic humans in Northern Italy." Ann N Y Acad Sci **990**: 134-40.
- Bruneval, P., J. Choucair, et al. (2001). "Detection of fastidious bacteria in cardiac valves in cases of blood culture negative endocarditis." J Clin Pathol **54**(3): 238-40.
- Brunt, J., L. Guptill, et al. (2006). "American Association of Feline Practitioners 2006 Panel report on diagnosis, treatment, and prevention of Bartonella spp. infections." J Feline Med Surg **8**(4): 213-26.
- Bucheton, B., L. Abel, et al. (2003). "Genetic control of visceral leishmaniasis in a Sudanese population: candidate gene testing indicates a linkage to the NRAMP1 region." Genes Immun **4**(2): 104-9.
- Buffet, P. A., Y. J. Garin, et al. (1996). "Therapeutic effect of reference antileishmanial agents in murine visceral leishmaniasis due to Leishmania infantum." Ann Trop Med Parasitol **90**(3): 295-302.
- Buhles, W. C., Jr., D. L. Huxsoll, et al. (1974). "Tropical canine pancytopenia: Clinical, hematologic, and serologic response of dogs to Ehrlichia canis infection, tetracycline therapy, and challenge inoculation." J Infect Dis **130**(4): 357-67.

- Buller, R. S., M. Arens, et al. (1999). "Ehrlichia ewingii, a newly recognized agent of human ehrlichiosis." N Engl J Med **341**(3): 148-55.
- Buonavoglia, D., P. Sagazio, et al. (1995). "Serological evidence of Ehrlichia canis in dogs in southern Italy." New Microbiol **18**(1): 83-6.
- Buoro, I. B., R. B. Atwell, et al. (1989). "Feline anaemia associated with Ehrlichia-like bodies in three domestic short-haired cats." Vet Rec **125**(17): 434-6.
- Burghen, G. A., W. R. Beisel, et al. (1971). "Development of hypergammaglobulinemia in tropical canine pancytopenia." Am J Vet Res **32**(5): 749-56.
- Cabassu, J. P., G. Haroutunian, et al. (1980). "Ehrlichia canis infection in a dog." Point Veterinaire **10**(48): 61-3.
- Cabassu, J. P., P. Gervais, et al. (1988a). "Manifestations cliniques de la leishmaniose canine." Prat Méd Chir Anim Comp **23**(5): 29-34.
- Cabassu, J. P., P. Gervais, et al. (1988b). "Bilan biologique chez le chien leishmanien." Prat Méd Chir Anim Comp **23**(5): 35-42.
- Cabral, M., J. E. O'Grady, et al. (1998). "The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs." Vet Parasitol **76**(3): 173-80.
- Cadenas, M. B., R. G. Maggi, et al. (2007). "Identification of bacteria from clinical samples using Bartonella alpha-Proteobacteria growth medium." J Microbiol Methods **71**(2): 147-55.
- Cairó, J. and J. Font, (1991). "Leishmaniosis canina. Aspectos clínicos." Clin Vet Peg Anim **2**: 73-81.
- Cairó, J. and C. Muntané (1997). "Chancro de inoculación en la leishmaniosis canina. Dos años después." XIV Jornadas Anuales AMVAC. pp. 123-6.
- Calic, S. B., M. A. Galvao, et al. (2004). "Human ehrlichioses in Brazil: first suspected cases." Braz J Infect Dis **8**(3): 259-62.
- Carithers, H. A. (1985). "Cat-scratch disease. An overview based on a study of 1,200 patients." Am J Dis Child **139**(11): 1124-33.
- Carpenter, T. L., M. C. McMeans, et al. (1990). "Additional instances of human parasitism by the brown dog tick (Acari: Ixodidae)." J Med Entomol **27**(6): 1065-6.
- Carrasco, L., F. C. de Lara, et al. (1997). "Acute haemorrhagic pancreatitis associated with canine visceral leishmaniasis." Vet Rec **141**(20): 519-21.
- Carrera, L., M. L. Fermin, et al. (1996). "Antibody response in dogs experimentally infected with Leishmania infantum: infection course antigen markers." Exp Parasitol **82**(2): 139-46.
- Case, J. B., B. Chomel, et al. (2006). "Serological survey of vector-borne zoonotic pathogens in pet cats and cats from animal shelters and feral colonies." J Feline Med Surg **8**(2): 111-7.
- Catarsini, O. (1989). "Leishmaniosi canina. Prognosi e profilassi." Editoriale Grasso, SCIVAC: pp. 81-85.
- Celaya, C. (1993). "Estudio epidemiológico descriptivo de la leishmaniasis canina en un entorno periurbano de la ciudad de Madrid. Parte I: seroprevalencia." Veterinaria en Madrid **5**(23): 13-5.
- Ciaramella, P., A. Pelagalli, et al. (2005). "Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by Leishmania infantum." Vet J **169**(3): 465-7.
- Cilla, G., M. Montes, et al. (2001). "Endocarditis por Bartonella henselae. Presentación de un caso y revisión de la literatura." An Med Interna **18**(5): 255-8.
- Clarridge, J. E., T. J. Raich, et al. (1995). "Strategy to detect and identify Bartonella species in routine clinical laboratory yields Bartonella henselae from human immunodeficiency virus-positive patient and unique Bartonella strain from his cat." J Clin Microbiol **33**(8): 2107-13.
- Cockerell, C. J., P. M. Tierno, et al. (1991). "Clinical, histologic, microbiologic, and biochemical characterization of the causative agent of bacillary (epithelioid) angiomatosis: a rickettsial illness with features of bartonellosis." J Invest Dermatol **97**(5): 812-7.
- Codner, E. C., R. E. Roberts, et al. (1985). "Atypical findings in 16 cases of canine ehrlichiosis." J Am Vet Med Assoc **186**(2): 166-9.
- Codner, E. C. and L. L. Farris-Smith (1986). "Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs." J Am Vet Med Assoc **189**(1): 47-50.
- Codner, E. C. and W. R. Maslin (1992). "Investigation of renal protein loss in dogs with acute experimentally induced Ehrlichia canis infection." Am J Vet Res **53**(3): 294-9.
- Cohn, L. A. (2003). "Ehrlichiosis and related infections." Vet Clin North Am Small Anim Pract **33**(4): 863-84.
- Coligan, J. E., A. M. Kruisbeek, et al. (1992). "Antibody detection and preparation." Current protocols in immunology. John Wiley and Sons. New York. Unit 2.4.
- Collins, K. B. and C. P. Moore (1991). "Canine anterior uvea." Veterinary Ophthalmology. K. N. Gelatt. Philadelphia, Lea and Febiger: pp. 357-95.
- Comer, J. A., W. L. Nicholson, et al. (1999). "Serologic testing for human granulocytic ehrlichiosis at a national referral center." J Clin Microbiol **37**(3): 558-64.
- Conesa-Gallego, E., E. Romera-Lozano, et al. (1997). "Estudio de las poblaciones de flebotomos (Diptera, Psychodidae) de la Comunidad de Madrid." An Biol **22**: 43-50.

- Cordero del Campillo, M. (1980). "Índice-catálogo de zooparásitos ibéricos." Servicio de Publicaciones del Ministerio de Sanidad y Seguridad Social. Madrid: p. 489.
- Cortadellas, O., M. J. Fernandez del Palacio, et al. (2008). "Glomerular filtration rate in dogs with leishmaniasis and chronic kidney disease." J Vet Intern Med **22**(2): 293-300.
- Costa Duraõ, J. F., E. Rebelo, et al. (1994). "Primeiro caso de leishmaniose em gato doméstico (*Felis catus domesticus*) detectado em Portugal (Concelho de Sesimbra): nota preliminar." RPCV **89**: 140-4.
- Coutinho, M. T., L. L. Bueno, et al. (2005). "Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis." Vet Parasitol **128**(1-2): 149-55.
- Coutinho, M. T. and P. M. Linardi (2007). "Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals?" Vet Parasitol **147**(3-4): 320-5.
- Cowell, R. L., R. D. Tyler, et al. (1988). "Ehrlichiosis and polyarthritis in three dogs." J Am Vet Med Assoc **192**(8): 1093-5.
- Craig, T. M., C. L. Barton, et al. (1986). "Dermal leishmaniasis in a Texas cat." Am J Trop Med Hyg **35**(6): 1100-2.
- Criado-Fornelio, A., A. Martinez-Marcos, et al. (2003). "Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and *Piroplasmids* in cats from southern Europe: a molecular study." Vet Microbiol **93**(4): 307-17.
- Culic, O., V. Erakovic, et al. (2002). "Azithromycin modulates neutrophil function and circulating inflammatory mediators in healthy human subjects." Eur J Pharmacol **450**(3): 277-289.
- Cupolillo, E., G. Grimaldi, Jr., et al. (1994). "A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy." Am J Trop Med Hyg **50**(3): 296-311.
- Cupp, E. W. (1991). "Biology of ticks." Vet Clin North Am Small Anim Pract **21**(1): 1-26.
- Chae, J. S., N. Pusterla, et al. (2000). "Infection of aquatic insects with trematode metacercariae carrying *Ehrlichia risticii*, the cause of Potomac horse fever." J Med Entomol **37**(4): 619-25.
- Chae, J. S., E. H. Kim, et al. (2003). "Prevalence and sequence analyses of *Neorickettsia risticii*." Ann N Y Acad Sci **990**: 248-56.
- Chaichanasiriwithaya, W., Y. Rikihisa, et al. (1994). "Antigenic, morphologic, and molecular characterization of new *Ehrlichia risticii* isolates." J Clin Microbiol **32**(12): 3026-33.
- Chang, W. L. and M. J. Pan (1996). "Specific amplification of *Ehrlichia platys* DNA from blood specimens by two-step PCR." J Clin Microbiol **34**(12): 3142-6.
- Chang, C., K. Yamamoto, et al. (1999). "Sero-epidemiology of *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* infection in California coyotes, 1994-1998." Emerg Infect Dis **5**(5): 711-5.
- Chang, C. C., R. W. Kasten, et al. (2000). "Coyotes (*Canis latrans*) as the reservoir for a human pathogenic *Bartonella* sp.: molecular epidemiology of *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* infection in coyotes from central coastal California." J Clin Microbiol **38**(11): 4193-4200.
- Chang, C. C., B. B. Chomel, et al. (2001). "Molecular evidence of *Bartonella* spp. in questing adult *Ixodes pacificus* ticks in California." J Clin Microbiol **39**(4): 1221-6.
- Chang, C. C., H. Hayashidani, et al. (2002). "Investigation of *Bartonella* infection in ixodid ticks from California." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **25**(4): 229-36.
- Charpentier, F. and P. Groulade (1986). "Un cas d'éhrlichiose probable chez le chat." Bulletin de l'Académie Vétérinaire **59**: 287-90.
- Chen, S. M., J. S. Dumler, et al. (1994). "Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease." J Clin Microbiol **32**(3): 589-95.
- Childs, J. E., J. A. Rooney, et al. (1994). "Epidemiologic observations on infection with *Rochalimaea* species among cats living in Baltimore, Md." J Am Vet Med Assoc **204**(11): 1775-8.
- Childs, J. E., J. G. Olson, et al. (1995). "Prevalence of antibodies to *Rochalimaea* species (cat-scratch disease agent) in cats." Vet Rec **136**(20): 519-20.
- Chomel, B. B., R. C. Abbott, et al. (1995). "*Bartonella henselae* prevalence in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers." J Clin Microbiol **33**(9): 2445-50.
- Chomel, B. B., R. W. Kasten, et al. (1996a). "Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea." J Clin Microbiol **34**(8): 1952-6.
- Chomel, B. (1996b). "*Bartonella* infection in domestic and wild cats in the USA. Association with ectoparasite infestation." International Conference on Emerging Zoonoses. Jerusalem, Israel.
- Chomel, B. B., E. T. Carlos, et al. (1999). "*Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* infection in domestic cats from The Philippines." Am J Trop Med Hyg **60**(4): 593-7.
- Chomel, B. B. (2000). "Cat-scratch disease." Rev Sci Tech **19**(1): 136-50.
- Chomel, B. B., K. A. MacDonald, et al. (2001). "Aortic valve endocarditis in a dog due to *Bartonella clarridgeiae*." J Clin Microbiol **39**(10): 3548-54.
- Chomel, B. B., A. C. Wey, et al. (2003a). "Isolation of *Bartonella washoensis* from a dog with mitral valve endocarditis." J Clin Microbiol **41**(11): 5327-32.
- Chomel, B. B., A. C. Wey, et al. (2003b). "Fatal case of endocarditis associated with *Bartonella henselae* type I infection in a domestic cat." J Clin Microbiol **41**(11): 5337-9.

- Chomel, B. B., Y. Kikuchi, et al. (2004). "Seroprevalence of Bartonella infection in American free-ranging and captive pumas (*Felis concolor*) and bobcats (*Lynx rufus*)." *Vet Res* **35**(2): 233-41.
- Chomel, B. B., H. J. Boulouis, et al. (2006). "Bartonella spp. in pets and effect on human health." *Emerg Infect Dis* **12**(3): 389-94.
- Christova, I. S. and J. S. Dumler (1999). "Human granulocytic ehrlichiosis in Bulgaria." *Am J Trop Med Hyg* **60**(1): 58-61.
- Chung, C. Y., R. W. Kasten, et al. (2004). "Bartonella spp. DNA associated with biting flies from California." *Emerg Infect Dis* **10**(7): 1311-3.
- D'Ambrosio, G., A. Agresti, et al. (1987). "Trattamento della leishmaniosi del cane. Impiego di un nuovo derivato dell'imidazolo." *Obiett Docum Veter* **8**(3): 31-4.
- da Costa, P. S., L. M. Valle, et al. (2006). "More about human monocytotropic ehrlichiosis in Brazil: serological evidence of nine new cases." *Braz J Infect Dis* **10**(1): 7-10.
- da Silva, A. V., C. D. de Souza Candido, et al. (2008). "The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil." *Acta Trop* **105**(1): 92-4.
- Dalmau, A., M. Ossó, et al. (2008). "Leishmaniosis felina a ropósito de un caso clínico. ¿Nos olvidamos de que existe?." *AVEPA* **28**(4): 233-237.
- Dalton, M. J., L. E. Robinson, et al. (1995). "Use of Bartonella antigens for serologic diagnosis of cat-scratch disease at a national referral center." *Arch Intern Med* **155**(15): 1670-6.
- Daly, J. S., M. G. Worthington, et al. (1993). "Rochalimaea elizabethae sp. nov. isolated from a patient with endocarditis." *J Clin Microbiol* **31**(4): 872-81.
- Daniels, T. J., G. R. Battaly, et al. (2002). "Avian reservoirs of the agent of human granulocytic ehrlichiosis?" *Emerg Infect Dis* **8**(12): 1524-5.
- Davoust, B., D. Parzy, et al. (1991). "Ehrlichiosis canine expérimentale. Étude clinique et thérapeutique." *Recueil de Médecine Vétérinaire* **167**: 33-40.
- Davoust, B., M. Boni, et al. (1998). "Evaluation de la lutte contre l'ehrlichiose canine en zone d'endémie." *Méd Mal Infect* **28**: 402-3.
- Davoust, B., J. L. Marie, et al. (2003). "Assay of fipronil efficacy to prevent canine monocytic ehrlichiosis in endemic areas." *Vet Parasitol* **112**(1-2): 91-100.
- Davoust, B., A. Keundjian, et al. (2005). "Validation of chemoprevention of canine monocytic ehrlichiosis ehrlichiosis with doxycycline." *Vet Microbiol* **107**(3-4): 279-83.
- Davoust, B., O. Bourry, et al. (2006). "Surveys on seroprevalence of canine monocytic ehrlichiosis among dogs living in the Ivory Coast and Gabon and evaluation of a quick commercial test kit dot-ELISA." *Ann N Y Acad Sci* **1078**: 464-9.
- Dawson, J. E., I. Abeygunawardena, et al. (1988). "Susceptibility of cats to infection with Ehrlichia risticii, causative agent of equine monocytic ehrlichiosis." *Am J Vet Res* **49**(12): 2096-100.
- Dawson, J. E., Y. Rikihisa, et al. (1991). "Serologic diagnosis of human ehrlichiosis using two Ehrlichia canis isolates." *J Infect Dis* **163**(3): 564-7.
- Dawson, J. E. and S. A. Ewing (1992). "Susceptibility of dogs to infection with Ehrlichia chaffeensis, causative agent of human ehrlichiosis." *Am J Vet Res* **53**(8): 1322-7.
- de la Fuente, J., A. Torina, et al. (2005a). "Serologic and molecular characterization of Anaplasma species infection in farm animals and ticks from Sicily." *Vet Parasitol* **133**(4): 357-62.
- de la Fuente, J., A. Torina, et al. (2005b). "Infection with Anaplasma phagocytophilum in a seronegative patient in Sicily, Italy: case report." *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **4**: 15.
- de Souza, A. I., R. S. Juliano, et al. (2005). "Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog." *Vet Parasitol* **129**(1-2): 51-4.
- Debre, R., M. Lamy, et al. (1950). "La maladie des griffes de chat." *Semin Hop Paris* **26**: 1895-901.
- Dehio, C. (2001a). "Bartonella interactions with endothelial cells and erythrocytes." *Trends Microbiol* **9**(6): 279-85.
- Dehio, C., C. Lanz, et al. (2001b). "Bartonella schoenbuchii sp. nov., isolated from the blood of wild roe deer." *Int J Syst Evol Microbiol* **51**(Pt 4): 1557-65.
- Dehio, C. (2003). "Recent progress in understanding Bartonella-induced vascular proliferation." *Curr Opin Microbiol* **6**(1): 61-5.
- Dehio, C. (2004). "Molecular and cellular basis of bartonella pathogenesis." *Annu Rev Microbiol* **58**: 365-90.
- Demma, L. J., R. C. Holman, et al. (2005). "Epidemiology of human ehrlichiosis and anaplasmosis in the United States, 2001-2002." *Am J Trop Med Hyg* **73**(2): 400-9.
- Denerolle, P. (1996). "Leishmaniose canine: difficultés du diagnostic et du traitement." *Prat Méd Chir Anim Comp* **31**: 137-145.
- Denerolle, P. and G. Bourdoiseau (1999). "Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniosis (96 cases)." *J Vet Int Med* **13**: 413-5.
- Dereeper A., V. Guignon, et al. (2008). *Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist* Nucleic Acids Research. 36 (Web Server Issue): W465-9. Epub 2008.
- Dereure, J. (1999). Réservoirs des leishmanies. In: *Les leishmanioses*. Paris, Collection Médecine tropicale de l'AUPÉLF-UREF, Marketing/Ellipses. pp. 109-127.

- Desjeux, P. (1996). "Leishmaniasis. Public health aspects and control." *Clin Dermatol* **14**(5): 417-23.
- Diniz, P. P., R. G. Maggi, et al. (2007). "Canine bartonellosis: serological and molecular prevalence in Brazil and evidence of co-infection with Bartonella henselae and Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii." *Vet Res* **38**(5): 697-710.
- Dogra, J. (1997). "Leishmaniasis therapy: Oral itraconazole versus intralesional berberine in cutaneous form." *First World Congress on Leishmaniasis*. pp. 179, Istanbul.
- Dokic, M., P. Curcic, et al. (2006). "[Human ehrlichiosis]." *Vojnosanit Pregl* **63**(4): 403-8.
- Donatien, A. and Lestoquard, F. (1935). "Existence en Algérie d'une Rickettsia du chien." *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* **28**(418-419).
- Donovan, C. (1994). "On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. 1903." *Natl Med J India* **7**(4): 196, 201-2.
- Drancourt, M., V. Moal, et al. (1996). "Bartonella (Rochalimaea) quintana infection in a seronegative hemodialyzed patient." *J Clin Microbiol* **34**(5): 1158-60.
- Droz, S., B. Chi, et al. (1999). "Bartonella koehlerae sp. nov., isolated from cats." *J Clin Microbiol* **37**(4): 1117-22.
- Dugan, V. G., S. E. Little, et al. (2000). "Natural infection of domestic goats with Ehrlichia chaffeensis." *J Clin Microbiol* **38**(1): 448-9.
- Dumler, J. S. and J. S. Bakken (1995). "Ehrlichial diseases of humans: emerging tick-borne infections." *Clin Infect Dis* **20**(5): 1102-10.
- Dumler, J. S. and J. S. Bakken (1996). "Human granulocytic ehrlichiosis in Wisconsin and Minnesota: a frequent infection with the potential for persistence." *J Infect Dis* **173**(4): 1027-30.
- Dumler, J. S. (1998). "Ehrlichioses: emerging infections." *Curr Opin Infect Dis* **11**(2): 183-7.
- Dumler, J. S., A. F. Barbet, et al. (2001). "Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila." *Int J Syst Evol Microbiol* **51**(Pt 6): 2145-65.
- Dumler, J. S., K. S. Choi, et al. (2005). "Human granulocytic anaplasmosis and Anaplasma phagocytophilum." *Emerg Infect Dis* **11**(12): 1828-34.
- Duncan, A. W., R. G. Maggi, et al. (2007). "A combined approach for the enhanced detection and isolation of Bartonella species in dog blood samples: pre-enrichment liquid culture followed by PCR and subculture onto agar plates." *J Microbiol Methods* **69**(2): 273-81.
- Dutra, F., L. F. Schuch, et al. (2001). "Equine monocytic Ehrlichiosis (Potomac horse fever) in horses in Uruguay and southern Brazil." *J Vet Diagn Invest* **13**(5): 433-7.
- Eberhardt, J. M., K. Neal, et al. (2006). "Prevalence of selected infectious disease agents in cats from Arizona." *J Feline Med Surg* **8**(3): 164-8.
- Eddlestone, S. M., T. M. Neer, et al. (2006). "Failure of imidocarb dipropionate to clear experimentally induced Ehrlichia canis infection in dogs." *J Vet Intern Med* **20**(4): 840-4.
- Eddlestone, S. M., P. P. Diniz, et al. (2007). "Doxycycline clearance of experimentally induced chronic Ehrlichia canis infection in dogs." *J Vet Intern Med* **21**(6): 1237-42.
- Egenvall, A., A. Bjoersdorff, et al. (1998). "Early manifestations of granulocytic ehrlichiosis in dogs inoculated experimentally with a Swedish Ehrlichia species isolate." *Vet Rec* **143**(15): 412-7.
- Elias, E. (1991). "Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of E. canis." *J Small Anim Pract* **33**: 540-543.
- Elias, E. and P. A. Homans, (1988). "Hepatozoon canis infection in dogs: clinical and haematological findings; treatment." *J Small Anim Pract* **29**: 55-62.
- Ellis, B. A., R. L. Regnery, et al. (1999). "Rats of the genus Rattus are reservoir hosts for pathogenic Bartonella species: an Old World origin for a New World disease?" *J Infect Dis* **180**(1): 220-4.
- Eng, T. R., J. R. Harkess, et al. (1990). "Epidemiologic, clinical, and laboratory findings of human ehrlichiosis in the United States, 1988." *Jama* **264**(17): 2251-8.
- Estrada-Peña, A. (1994). "Las garrapatas en España: introducción." *Consejería de Sanidad y Bienestar Social. Junta de Castilla y León*. Valladolid.
- Estrada-Peña, A. (1995). "Catálogo geográfico de las garrapatas en la Península Ibérica." Ed. Mallinckrodt Veterinary, Pontevedra. pp. 1-186.
- Estrada-Peña, A., J. M., et al. (2004). "Phenology of the tick, Ixodes ricinus, in its southern distribution range (central Spain)." *Med Vet Entomol* **18**(4): 387-97.
- Euzeby, J. (1982). "Thérapeutique actuelle et nouveaux concepts." *Prat Méd Chir Anim Comp* **133**(6): 383-90.
- Euzeby, J. (1988). "Thérapeutique actuelle et nouveaux concepts." *Prat Méd Chir Anim Comp* **23**: Suppl 5: 103-10.
- Evans, D. A. (1978). "Kinetoplastida." In: *Methods of cultivating parasites in vitro* (A.E.R. Taylor and J.R. Baker, eds), pp. 55-88. London, New York and San Francisco: Academic Press.
- Everitt, B. S. (1992). *The Analysis of Contingency Tables*. Chapman & Hall. Second Edition.
- Ewing, S. A. (1969). "Canine ehrlichiosis." *Adv Vet Sci Comp Med* **13**: 331-53.
- Ewing, S. A., W. R. Roberson, et al. (1971). "A new strain of Ehrlichia canis." *J Am Vet Med Assoc* **159**(12): 1771-4.

- Fabbi, M., L. de Giuli, et al. (2004). "Prevalence of *Bartonella henselae* in Italian stray cats: evaluation of serology to assess the risk of transmission of *Bartonella* to humans." *J Clin Microbiol* **42**: 264-8.
- Family-Pigne, D., B. Mouchet, et al. (2006). "[Hepatosplenic localization of cat scratch disease: two cases in immunocompetent adult patients]." *Rev Med Interne* **27**(10): 772-5.
- Fernandez-Bellon, H., L. Solano-Gallego, et al. (2008). "Little evidence of seasonal variation of natural infection by *Leishmania infantum* in dogs in Spain." *Vet Parasitol* **155**(1-2): 32-6.
- Fernández-Soto, P., R. Pérez-Sánchez, et al. (2006). "*Rickettsia slovaca* in Dermacentor ticks found on humans in Spain." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **25**: 129-131.
- Ferrán Aranaz, M. (1996). *SPSS para Windows. Programación y Análisis Estadístico*. Mc Graw Hill.
- Ferrer, L., R. M. Rabanal, et al. (1988). "Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining." *Res Vet Sci* **44**: 194-6.
- Ferrer, L. (1992). *Leishmaniasis*. Bonagura J. D. (ed.). Philadelphia, WB Saunders. pp. 266-70.
- Ferrer, L., M. J. Aisa, et al. (1995). "Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis." *Vet Rec* **136**(20): 514-6.
- Ferrer, L. (1997a). "Leishmaniosis." *XIV Jornadas Anuales AMVAC*. pp. 99-111, Madrid.
- Ferrer, L. (1997b). "Leishmaniosis: update in diagnosis and therapy." *14th Annual Congress on ESVD-ECVD*. pp. 33-6, Pisa.
- Ferres, M., K. Abarca, et al. (2005). "[Presence of *Bartonella henselae* in cats: natural reservoir quantification and human exposition risk of this zoonoses in Chile]." *Rev Med Chil* **133**(12): 1465-71.
- Finkelstein, J. L., T. P. Brown, et al. (2002). "Studies on the growth of *Bartonella henselae* in the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae)." *J Med Entomol* **39**(6): 915-9.
- Fisa, R., M. Gallego, et al. (1997). "Serologic diagnosis of canine leishmaniasis by dot-ELISA." *J Vet Diagn Invest* **9**(1): 50-5.
- Fisa, R., M. Gallego, et al. (1999). "Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus." *Vet Parasitol* **83**(2): 87-97.
- Fisa, R., C. Riera, et al. (2001). "Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates." *Vet Parasitol* **99**(2): 105-11.
- Fishbein, D. B., J. E. Dawson, et al. (1994). "Human ehrlichiosis in the United States, 1985 to 1990." *Ann Intern Med* **120**(9): 736-43.
- Flexman, J. P., N. J. Lavis, et al. (1995). "*Bartonella henselae* is a causative agent of cat scratch disease in Australia." *J Infect* **31**(3): 241-5.
- Foil, L., E. Andress, et al. (1998). "Experimental infection of domestic cats with *Bartonella henselae* by inoculation of *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae) feces." *J Med Entomol* **35**(5): 625-8.
- Foley, J. E., B. Chomel, et al. (1998). "Seroprevalence of *Bartonella henselae* in cattery cats: association with cattery hygiene and flea infestation." *Vet Q* **20**(1): 1-5.
- Foley, J. E., C. M. Leutenegger, et al. (2003). "Evidence for modulated immune response to *Anaplasma phagocytophila* sensu lato in cats with FIV-induced immunosuppression." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **26**(2): 103-13.
- Font, J., J. Cairó, et al. (1988). "Ehrlichiosis canina." *Revista de AVEPA* **8**: 141-8.
- Font, A., N. Durall, et al. (1993). "Cardiac tamponade in a dog with visceral leishmaniasis." *JAAHA* **29**: 95-100.
- Font, A. (1996a). "Consider leishmaniasis in differential for monoclonal gammopathies in dogs." *JAVMA* **208**(2): 184.
- Font, A., X. Roura, et al. (1996b). "Canine mucosal leishmaniasis." *JAAHA* **32**: 131-7.
- Franc, M. (1993). "La leishmaniose canine." *Rec Méd Vét* **169**(5/6): 433-7.
- Francino, O., L. Altet, et al. (2006). "Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis." *Vet Parasitol* **137**(3-4): 214-21.
- Frank, J. R. and E. B. Breitschwerdt (1999). "A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia." *J Vet Intern Med* **13**(3): 194-201.
- Freitas, E., L. O. Martinez, et al. (1997). "Potential transmission of the visceral leishmaniosis by blood transfusion in veterinary medicine." *First World Congress on Leishmaniasis, Istanbul*. pp. 148.
- Fukuda, T., Y. Keida, et al. (1954). "Studies on causative agent of 'Hyuga netsu' disease." *Med Biol* **23**: 200-5.
- Gallego, M. (2004). "Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniosis." *Rev Sci tech Off int Epiz* **23**(2): 661-76.
- García, J. C., M. J. Nunez, et al. (2006). "Human anaplasmosis: the first Spanish case confirmed by PCR." *Ann N Y Acad Sci* **1078**: 545-7.
- García-Alonso, M., A. Blanco, et al. (1996). "Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis." *Parasite Immunol* **18**(12): 617-23.
- García-Caceres, U. and F. U. García (1991). "Bartonellosis. An immunodepressive disease and the life of Daniel Alcides Carrion." *Am J Clin Pathol* **95**(4 Suppl 1): S58-66.
- García-García, J. A., R. Baquerizo, et al. (2005). "[Prevalence of serum antibodies against *Bartonella* spp. in a health population from the south area of the Seville province]." *Rev Clin Esp* **205**(11): 541-4.

- García-Verdugo, M. J. (1996). "Análisis de la respuesta inmune humoral en leishmaniosis canina: repercusiones inmunopatológicas (tesis doctoral)." Departamento de Medicina y Sanidad Animal, Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Cáceres, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres.
- Gardner, S. L., R. C. Holman, et al. (2003). "National surveillance for the human ehrlichiosis in the United States, 1997-2001, and proposed methods for evaluation of data quality." *Ann N Y Acad Sci* **990**: 80-9.
- Garris, G. I. (1991). "Control of ticks." *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **21**(1): 173-83.
- Gascón, F. M. (1994). "Leishmaniosis canina: aspectos pronósticos y terapéuticos." *Congreso Nacional de AVEPA*. pp. 171-6; Barcelona.
- Gasquet, S., M. Maurin, et al. (1998). "Bacillary angiomatosis in immunocompromised patients." *Aids* **12**(14): 1793-803.
- Gaunt, S. D., D. C. Baker, et al. (1990). "Platelet aggregation studies in dogs with acute Ehrlichia platys infection." *Am J Vet Res* **51**(2): 290-3.
- Gelatt, K., N. (1991). "Canine anterior uvea." In: *Veterinary Ophthalmology*. K. N. Gelatt. Philadelphia, Lea and Febiger: pp. 374-5.
- Giauffret, A., R. Sanchis, et al. (1976). "Les examens de laboratoire dans la leishmaniose canine. I. Application au diagnostic, au pronostic et au contrôle du traitement dans la maladie naturelle." *Revue Méd Vét* **127**(6): 913-30.
- Gil Collado, J., F. Morillas, et al. (1989). "Los flebotomos en España." *Rev San Hig Púb* **63**: 15-34.
- Giladi, M., Y. Kletter, et al. (2001). "Enzyme immunoassay for the diagnosis of cat-scratch disease defined by polymerase chain reaction." *Clin Infect Dis* **33**(11): 1852-8.
- Gillespie, T. N., R. J. Washabau, et al. (2003). "Detection of Bartonella henselae and Bartonella clarridgeiae DNA in hepatic specimens from two dogs with hepatic disease." *J Am Vet Med Assoc* **222**(1): 47-51, 35.
- Glaser, B. and R. Gothe (1998). "[Imported arthropod-borne parasites and parasitic arthropods in dogs. Species spectrum and epidemiologic analysis of the cases diagnosed in 1995/96]." *Tierarztl Prax Ausg K Klientiere Heimtiere* **26**(1): 40-6.
- Glaus, T., R. Hofmann-Lehmann, et al. (1997). "Seroprevalence of Bartonella henselae infection and correlation with disease status in cats in Switzerland." *J Clin Microbiol* **35**(11): 2883-5.
- Glaze, M. B. and S. D. Gaunt (1986). "Uveitis associated with Ehrlichia platys infection in a dog." *J Am Vet Med Assoc* **189**(8): 916-7.
- Goddard, J. (1989). "Focus of human parasitism by the brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae)." *J Med Entomol* **26**(6): 628-9.
- Goldman, E. E., E. B. Breitschwerdt, et al. (1998). "Granulocytic ehrlichiosis in dogs from North Carolina and Virginia." *J Vet Intern Med* **12**(2): 61-70.
- González, V. (1955). "Focos enzoóticos de leishmaniosis canina en Madrid." *Cons Gral Coleg Vet España* **9**: 373-85.
- González, J. M., V. Puig, et al. (2000). "Seroprevalencia de ehrlichiosis canina en la provincia de Valencia." *Consulta de Difusión Veterinaria* **76**: 67-71.
- Goodfellow, M. and S. Susan, (2005). "Exotic diseases of dogs and cats at risk of importation to Ireland." *Irish Veterinary Journal* **58**(5): 271-7.
- Goodman, J. L., C. Nelson, et al. (1996). "Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis." *N Engl J Med* **334**(4): 209-15.
- Goodman, R. A., E. C. Hawkins, et al. (2003). "Molecular identification of Ehrlichia ewingii infection in dogs: 15 cases (1997-2001)." *J Am Vet Med Assoc* **222**(8): 1102-7.
- Gothe, R. (1998). "[Ehrlichia canis infections of dogs in Germany. Epidemiology, diagnosis, therapy and prophylaxis]." *Tierarztl Prax Ausg K Klientiere Heimtiere* **26**(6): 396-401.
- Gouriet, F., F. Fenollar, et al. (2005). "Use of shell-vial cell culture assay for isolation of bacteria from clinical specimens: 13 years of experience." *J Clin Microbiol* **43**(10): 4993-5002.
- Gradoni, L., M. Gramiccia, et al. (1988). "Studies on canine leishmaniasis control. 2. Effectiveness of control measures against canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **82**(4): 568-71.
- Gramiccia, M., L. Gradoni, et al. (1992). "Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of Leishmania infantum isolated from dogs after several courses of drug treatment." *Ann Trop Med Parasitol* **86**(6): 613-20.
- Gramiccia, M., Gradoni, L. (2005). "The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to diseases control." *Intern J Parasitol* **35**: 1169-1180.
- Gray, J. S., H. Dautel, et al. (2009). "Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe." *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, vol. 2009, Article ID 593232, 12 pages, 2009. doi:10.1155/2009/593232.
- Greene, C. E. and J. W. Harvey (1984). "Canine ehrlichiosis." En: *Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat*. C. E. Greene. Philadelphia, W. B. Saunders: pp. 704-9.
- Greene, C. E., W. Burgdorfer, et al. (1985). "Rocky Mountain spotted fever in dogs and its differentiation from canine ehrlichiosis." *J Am Vet Med Assoc* **186**(5): 465-72.
- Greene, R. T. (1995). "Canine ehrlichiosis: clinical implications for humoral factors." *Kirk's Current Veterinary Therapy XII, Small Animal Practice*. Philadelphia, WB Saunders: pp. 290-3.
- Greene, C. E., M. McDermott, et al. (1996). "Bartonella henselae infection in cats: evaluation during primary infection, treatment, and rechallenge infection." *J Clin Microbiol* **34**(7): 1682-5.

- Greene, C. (1997). unpublished data. Athens, GA., University of Georgia.
- Greig, B., K. M. Asanovich, et al. (1996). "Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs." *J Clin Microbiol* **34**(1): 44-8.
- Greig, B., E. B., Breitschwerdt, et al. (2006a). "Canine granulocytotropic ehrlichiosis (*E. ewingii* infection)". In: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. C. E. Greene (ed.). Canada, Saunders Elsevier: 217-219.
- Greig, B., P. J., Armstrong (2006b). "Canine granulocytotropic anaplasmosis (*A. phagocytophilum* infection)". In: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. C. E. Greene (ed.). Canada, Saunders Elsevier: 219-224.
- Grevot, A., P. Jaussaud Hugues, et al. (2005). "Leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in a FIV and FeIV positive cat with a squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods". *Parasite* **12**: 271-275.
- Groulade, P. (1983). "L'électrophorèse des protéines sériques dans la leishmaniose canine." *Revue Méd Vét* **134**(12): 701-8.
- Groves, M. G., G. L. Dennis, et al. (1975). "Transmission of Ehrlichia canis to dogs by ticks (Rhipicephalus sanguineus)." *Am J Vet Res* **36**(7): 937-40.
- Groves, M. G. and K. S. Harrington (1994). "Rochalimaea henselae infections: newly recognized zoonoses transmitted by domestic cats." *J Am Vet Med Assoc* **204**(2): 267-71.
- Guillén, J. L., M. L. López, et al. (2002). "Differential serological testing by simultaneous indirect immunofluorescent antibody test in canine leishmaniosis and ehrlichiosis." *Vet Parasitol* **109**(3-4): 185-90.
- Guibal, F., P. de La Salmoniere, et al. (2001). "High seroprevalence to Bartonella quintana in homeless patients with cutaneous parasitic infestations in downtown Paris." *J Am Acad Dermatol* **44**(2): 219-23.
- Guptill, L., L. Slater, et al. (1997). "Experimental infection of young specific pathogen-free cats with Bartonella henselae." *J Infect Dis* **176**(1): 206-16.
- Guptill, L., L. N. Slater, et al. (1998). "Evidence of reproductive failure and lack of perinatal transmission of Bartonella henselae in experimentally infected cats." *Vet Immunol Immunopathol* **65**(2-4): 177-89.
- Guptill, L., C. C. Wu, et al. (2000). "Extracellular Bartonella henselae and artifactual intraerythrocytic pseudoinclusions in experimentally infected cats." *Vet Microbiol* **76**(3): 283-90.
- Guptill, L. (2006). "Feline bartonellosis." *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, third ed. C. E. Greene. Philadelphia, Saunders Elsevier: pp. 511-8.
- Gurfield, A. N., H. J. Boulouis, et al. (1997). "Coinfection with Bartonella clarridgeiae and Bartonella henselae and with different Bartonella henselae strains in domestic cats." *J Clin Microbiol* **35**(8): 2120-3.
- Gurfield, A. N., H. J. Boulouis, et al. (2001). "Epidemiology of Bartonella infection in domestic cats in France." *Vet Microbiol* **80**(2): 185-98.
- Guy, M., W. Bailey, et al. (1993). "Canine leishmaniasis." *Vet Rec* **132**(15): 396.
- Hardy, W. D., Jr. (2004). "Bartonella-induced inflammatory diseases of cats: An increasing spectrum." *4th International Conference on Bartonella as Emerging Pathogens*, Upsala, Sweden.
- Harris, M. P. (1994). "Suspected transmission of leishmaniasis." *Vet Rec* **135**(14): 339.
- Harrison, B. A., B. R. Engber, et al. (1997). "Ticks (Acari: Ixodida) uncommonly found biting humans in North Carolina." *J Vector Ecol* **22**(1): 6-12.
- Harrus, S., T. Waner, et al. (1996a). "Serum protein alterations in canine ehrlichiosis." *Vet Parasitol* **66**(3-4): 241-9.
- Harrus, S., T. Waner, et al. (1996b). "Platelet dysfunction associated with experimental acute canine ehrlichiosis." *Vet Rec* **139**(12): 290-3.
- Harrus, S., T. Waner, et al. (1996c). "Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis." *Vet Immunol Immunopathol* **51**(1-2): 13-20.
- Harrus, S., I. Aroch, et al. (1997a). "Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia." *Vet Rec* **141**(10): 247-50.
- Harrus, S., H. Bark, et al. (1997b). "Canine monocytic ehrlichiosis: an update." *Comp Cont Educ Pract Vet* **19**: 431-43.
- Harrus, S., P. H. Kass, et al. (1997c). "Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease." *Vet Rec* **141**(14): 360-3.
- Harrus, S., R. Ofri, et al. (1998a). "Acute blindness associated with monoclonal gammopathy induced by Ehrlichia canis infection." *Vet Parasitol* **78**(2): 155-60.
- Harrus, S., T. Waner, et al. (1998b). "Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: evaluation of a 6-week course." *J Clin Microbiol* **36**(7): 2140-2.
- Harrus, S., T. Waner, et al. (1998c). "Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with Ehrlichia canis." *J Clin Microbiol* **36**(1): 73-6.
- Harrus, S., T. Waner, et al. (1998d). "Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis." *Vet Immunol Immunopathol* **62**(1): 15-27.
- Harrus, S., T. Waner, et al. (1999). "Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis." *J Clin Microbiol* **37**(9): 2745-9.
- Harrus, S., A. R. Alleman, et al. (2002). "Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with Ehrlichia canis." *Vet Microbiol* **86**(4): 361-8.

- Harrus, S., T. Waner, et al. (2004). "Rickettsiales." In: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Australia, Blackwell Publishing: pp. 425-44.
- Harvey, J. W., C. F. Simpson, et al. (1978). "Cyclic thrombocytopenia induced by a Rickettsia-like agent in dogs." J Infect Dis **137**(2): 182-8.
- Hashiguchi, Y., E. A. Gomez, et al. (1991). "Andean leishmaniasis in Ecuador caused by infection with *Leishmania mexicana* and *L. major*-like parasites." Am J Trop Med Hyg **44**(2): 205-17.
- Heeb, H. L., M. J. Wilkerson, et al. (2003). "Large granular lymphocytosis, lymphocyte subset inversion, thrombocytopenia, dysproteinemia, and positive Ehrlichia serology in a dog." J Am Anim Hosp Assoc **39**(4): 379-84.
- Hegarty, B. C., M. G. Levy, et al. (1997). "Immunoblot analysis of the immunoglobulin G response to *Ehrlichia canis* in dogs: an international survey." J Vet Diagn Invest **9**(1): 32-8.
- Heimer, R., A. Van Andel, et al. (1997). "Propagation of granulocytic *Ehrlichia* spp. from human and equine spurs in HL-60 cells induced to differentiate into functional granulocytes." Clin Microbiol **35**(4): 923-7.
- Heller, R., M. Artois, et al. (1997). "Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in stray cats." J Clin Microbiol **35**(6): 1327-31.
- Heller, R., P. Riegel, et al. (1998). "*Bartonella tribocorum* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rats." Int J Syst Bacteriol **48 Pt 4**: 1333-9.
- Heller, R., M. Kubina, et al. (1999). "*Bartonella alsatica* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rabbits." Int J Syst Bacteriol **49 Pt 1**: 283-8.
- Herrero, C., C. Pelaz, et al. (1992). "Evidence of the presence of spotted fever group rickettsiae in dogs and dog ticks of the central provinces in Spain." Eur J Epidemiol **8**(4): 575-9.
- Herrero, J. I. and R. R. Beltrán (1994). "La fiebre exantemática mediterránea: a propósito de un estudio en la provincia de Salamanca." Junta de Castilla y León, Consejería de Sanidad y Bienestar Social.
- Hervas, J., A. Mendez, et al. (1996). Pathological study of visceral leishmaniasis in a jackal (*Canis aureus*). Vet Rec **139**: 293-295.
- Hervas, J., M. D. L. F. Chacon, et al. (1999). "Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniosis in Spain." J Feline Med Surg **1**(2): 101-5.
- Hervas, J., M. Chacon-Manrique de Lara, et al. (2001). "Granulomatous (pseudotumoral) iridocyclitis associated with leishmaniasis in a cat." Vet Rec **149**: 624-5.
- Hibler, S. C., Hoskins, J. D., Greene, C. E. (1986). "Rickettsial infections in dogs: part II. Ehrlichiosis and infectious cyclic thrombocytopenia." Comp Cont Educ Pract Vet **8**: 106-114.
- Higgins, J. A., S. Radulovic, et al. (1996). "Acquisition of the cat scratch disease agent *Bartonella henselae* by cat fleas (*Siphonaptera: Pulicidae*)." J Med Entomol **33**(3): 490-5.
- Hildebrandt, P. K., D. L. Huxsoll, et al. (1973). "Pathology of canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia)." Am J Vet Res **34**: 1309-20.
- Hinrichsen, V. L., U. G. Whitworth, et al. (2001). "Assessing the association between the geographic distribution of deer ticks and seropositivity rates to various tick-transmitted disease organisms in dogs." J Am Vet Med Assoc **218**(7): 1092-7.
- Hjelm, E., S. McGill, et al. (2002). "Prevalence of antibodies to *Bartonella henselae*, *B. elizabethae* and *B. quintana* in Swedish domestic cats." Scand J Dis **34**: 192-6.
- Hmiel, S. P., R. Buller, et al. (1998). "Human infection with *Ehrlichia ewingii*, the agent of Ozark canine granulocytic ehrlichiosis." First International Conference on Emerging Infectious Diseases, Atlanta, Georgia, Addendum: 4.
- Hofmeister, E. K., C. P. Kolbert, et al. (1998). "Cosegregation of a novel *Bartonella* species with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* in *Peromyscus leucopus*." J Infect Dis **177**(2): 409-16.
- Holland, C. J., M. Ristic, et al. (1985a). "Adaptation of *Ehrlichia sennetsu* to canine blood monocytes: preliminary structural and serological studies with cell culture-derived *Ehrlichia sennetsu*." Infect Immun **48**(2): 366-71.
- Holland, C. J., E. Weiss, et al. (1985b). "*Ehrlichia risticii* sp. nov.: etiological agent of equine monocytic ehrlichiosis (synonym Potomac horse fever)." Int J Syst Bacteriol **35**: 524-6.
- Holmberg, M., S. McGill, et al. (1999). "Evaluation of human seroreactivity to *Bartonella* species in Sweden." J Clin Microbiol **37**(5): 1381-4.
- Holzmuller, P., M. Hide, et al. (2006). "*Leishmania infantum* amastigotes resistant to nitric oxide cytotoxicity: Impact on in vitro parasite developmental cycle and metabolic enzyme activities." Infect Genet Evol **6**(3): 187-97.
- Hopkins, K. L., S. F. Simoneaux, et al. (1996). "Imaging manifestations of cat-scratch disease." AJR Am J Roentgenol **166**(2): 435-8.
- Hoskins, J. D. and E. W. Cupp (1988). "Ticks of veterinary importance: Part I. The *Ixodidae* family: identification, behaviour and associated diseases." Comp Cont Educ Pract Vet **10**(5): 564-80.
- Hoskins, J. D. (1991). "Tick-borne zoonoses: Lyme disease, ehrlichiosis, and Rocky Mountain spotted fever." Semin Vet Med Surg (Small Anim) **6**(3): 236-43.
- Hotopp, J. C., M. Lin, et al. (2006). "Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents." PLoS Genet **2**(2): e21.

- Hua, P., M. Yuhai, et al. (2000). "Canine ehrlichiosis caused simultaneously by Ehrlichia canis and Ehrlichia platys." *Microbiol Immunol* **44**(9): 737-9.
- Huxsoll, D. L., P. K. Hildebrandt, et al. (1969). "Ehrlichia canis--the causative agent of a haemorrhagic disease of dogs?" *Vet Rec* **85**(21): 587.
- Huxsoll, D. L., P. K. Hildebrandt, et al. (1970). "Tropical canine pancytopenia." *J Am Vet Med Assoc* **157**(11): 1627-32.
- Huxsoll, D. L., H. L. Amyx, et al. (1972). "Laboratory studies of tropical canine pancytopenia." *Exp Parasitol* **31**(1): 53-9.
- Huxsoll, D. L. (1975). "Canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia): a review." *Vet Parasitol* **2**: 49-60.
- Iniesta, L., S. Fernandez-Barredo, et al. (2002). "Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs." *Clin Diagn Lab Immunol* **9**(5): 1137-41.
- Inokuma, H., D. Raoult, et al. (2000). "Detection of Ehrlichia platys DNA in brown dog ticks (Rhipicephalus sanguineus) in Okinawa Island, Japan." *J Clin Microbiol* **38**(11): 4219-21.
- Inokuma, H., K. Ohno, et al. (2001). "Detection of ehrlichial infection by PCR in dogs from Yamaguchi and Okinawa Prefectures, Japan." *J Vet Med Sci* **63**(7): 815-7.
- Iqbal, Z., W. Chaichanasiriwithaya, et al. (1994). "Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis." *J Clin Microbiol* **32**(7): 1658-62.
- Irwin, P. J. (2002). "Companion animal parasitology: a clinical perspective." *Int J Parasitol* **32**(5): 581-93.
- Ishak, A. M., S. Radecki, et al. (2007). "Prevalence of Mycoplasma haemofelis, 'Candidatus Mycoplasma haemominutum', Bartonella species, Ehrlichia species, and Anaplasma phagocytophilum DNA in the blood of cats with anemia." *J Feline Med Surg* **9**(1): 1-7.
- Ives, T. J., E. L. Marston, et al. (2000). "In vitro susceptibilities of Rickettsia and Bartonella spp. to 14-hydroxy-clarithromycin as determined by immunofluorescent antibody analysis of infected vero cell monolayers." *J Antimicrob Chemother* **45**(3): 305-10.
- Jackson, L. A., D. H. Spach, et al. (1996). "Seroprevalence to Bartonella quintana among patients at a community clinic in downtown Seattle." *J Infect Dis* **173**(4): 1023-6.
- Jameson, P., C. Greene, et al. (1995). "Prevalence of Bartonella henselae antibodies in pet cats throughout regions of North America." *J Infect Dis* **172**(4): 1145-9.
- Jensen, W. A., M. Z. Fall, et al. (2000). "Rapid identification and differentiation of Bartonella species using a single-step PCR assay." *J Clin Microbiol* **38**(5): 1717-22.
- Jimenez, M., M. Ferrer-Dufol, et al. (1995). "Variability of Leishmania (Leishmania) infantum among stocks from immunocompromised, immunocompetent patients and dogs in Spain." *FEMS Microbiol Lett* **131**(2): 197-204.
- Jittapalapong, S. and W. Jansawan, (1993). "Preliminary survey on blood parasites of cats in Bangkok District area." *Kasetsart J Nat Sci* **27**: 330-5.
- Johansson, K. E., B. Pettersson, et al. (1995). "Identification of the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in Swedish dogs and horses by direct solid phase sequencing of PCR products from the 16S rRNA gene." *Res Vet Sci* **58**(2): 109-12.
- Johnson, R. N., P. M. Ngumbi, et al. (1993). "Host feeding preference of Phlebotomus guggisbergi, a vector of Leishmania tropica in Kenya." *Med Vet Entomol* **7**: 216-8.
- Johnson, E. M., S. A. Ewing, et al. (1998). "Experimental transmission of Ehrlichia canis (Rickettsiales: Ehrlichieae) by Dermacentor variabilis (Acari: Ixodidae)." *Vet Parasitol* **74**(2-4): 277-88.
- Johnson, G., M. Ayers, et al. (2003). "Detection and identification of Bartonella species pathogenic for humans by PCR amplification targeting the riboflavin synthase gene (ribC)." *J Clin Microbiol* **41**(3): 1069-72.
- Jones, S. L., R. Maggi, et al. (2008). "Detection of Bartonella henselae in the blood of 2 adult horses." *J Vet Intern Med* **22**(2): 495-8.
- Joseph, A. K., C. W. Wood, et al. (1997). "Bartonella henselae bacteraemia in domestic cats from Auckland." *N Z Vet J* **45**(5): 185-7.
- Juttner, C., M. Rodriguez Sanchez, et al. (2001). "Evaluation of the potential causes of epistaxis in dogs with natural visceral leishmaniasis." *Vet Rec* **149**(6): 176-9.
- Kabeya, H., M. Sase, et al. (2006). "Predominant T helper 2 immune responses against Bartonella henselae in naturally infected cats." *Microbiol Immunol* **50**(3): 171-8.
- Kager, P. A., P. H. Rees, et al. (1981). "Allopurinol in the treatment of visceral leishmaniasis." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **75**(4): 556-9.
- Kakoma, I., C. A. Carson, et al. (1977). "Autologous lymphocyte-mediated cytotoxicity against monocytes in canine ehrlichiosis." *Am J Vet Res* **38**(10): 1557-9.
- Kakoma, I., C. A. Carson, et al. (1978). "Platelet migration inhibition as an indicator of immunologically mediated target cell injury in canine ehrlichiosis." *Infect Immun* **20**(1): 242-7.
- Kakoma, I., C. A. Carson, et al. (1980). "Direct and indirect lymphocyte participation in the immunity and immunopathology of tropical canine pancytopenia--a review." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **3**(3): 291-8.
- Kakoma, I., R. D. Hansen, et al. (1994). "Cultural, molecular, and immunological characterization of the etiologic agent for atypical canine ehrlichiosis." *J Clin Microbiol* **32**(1): 170-5.
- Kakoma, I., A. Sainz, et al. (2000). "Standardization of the diagnostic criteria for canine ehrlichiosis. Towards a universal case definition." *Ann N Y Acad Sci* **916**: 396-403.

- Kanter, M., J. Mott, et al. (2000). "Analysis of 16S rRNA and 51-kilodalton antigen gene and transmission in mice of *Ehrlichia risticii* in virgulate trematodes from *Elimia livescens* snails in Ohio." *J Clin Microbiol* **38**(9): 3349-58.
- Kaplan, M. H., N. Sadick, et al. (1987). "Dermatologic findings and manifestations of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)." *J Am Acad Dermatol* **16**(3 Pt 1): 485-506.
- Kawahara, M., C. Suto, et al. (1993). "Characterization of ehrlichial organisms isolated from a wild mouse." *J Clin Microbiol* **31**(1): 89-96.
- Keefe, T. J., C. J. Holland, et al. (1982). "Distribution of *Ehrlichia canis* among military working dogs in the world and selected civilian dogs in the United States." *J Am Vet Med Assoc* **181**(3): 236-8.
- Keenan, C. M., L. D. Hendricks, et al. (1984). "Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. II. Pathology." *Vet Pathol* **21**(1): 80-6.
- Kelly, P. J., S. D. Carter, et al. (1994). "Absence of antinuclear antibodies in dogs infected with *Ehrlichia canis*." *Vet Rec* **134**(15): 382.
- Kelly, P. J., L. A. Matthewman, et al. (1996). "Bartonella (Rochalimaea) henselae in southern Africa--evidence for infections in domestic cats and implications for veterinarians." *J S Afr Vet Assoc* **67**(4): 182-7.
- Keret, D., M. Giladi, et al. (1998). "Cat-scratch disease osteomyelitis from a dog scratch." *J Bone Joint Surg Br* **80**(5): 766-7.
- Kerkhoff, F. T., A. M. Bergmans, et al. (1999). "Demonstration of Bartonella grahamii DNA in ocular fluids of a patient with neuroretinitis." *J Clin Microbiol* **37**(12): 4034-8.
- Ketring, K. L., E. E. Zuckerman, et al. (2004). "Bartonella: a new etiological agent of feline ocular disease." *J Am Anim Hosp Assoc* **40**(1): 6-12.
- Keysary, A., T. Waner, et al. (1996). "The first isolation, in vitro propagation, and genetic characterization of *Ehrlichia canis* in Israel." *Vet Parasitol* **62**(3-4): 331-40.
- Killick-Kendrick, R. (1990). "Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review." *Med Vet Entomol* **4**(1): 1-24.
- Killick-Kendrick, R., M. Killick-Kendrick, et al. (1994). "A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with *Leishmania infantum* promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies." *Parasite* **1**(4): 311-8.
- Killick-Kendrick, R., M. Killick-Kendrick, et al. (1997). "Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis." *Med Vet Entomol* **11**(2): 105-11.
- Kirkpatrick, C. E., J. P. Farrell, et al. (1984). "Leishmania chagasi and L. donovani: experimental infections in domestic cats." *Exp Parasitol* **58**(2): 125-31.
- Kirkpatrick, C. E., F. M. Moore, et al. (1989). "Argyrophilic, intracellular bacteria in some cats with idiopathic peripheral lymphadenopathy." *J Comp Pathol* **101**(3): 341-9.
- Klag, A. R., L. E. Dunbar, et al. (1991). "Concurrent ehrlichiosis and babesiosis in a dog." *Can Vet J* **32**(5): 305-307.
- Klein, M. B., C. M. Nelson, et al. (1997). "Antibiotic susceptibility of the newly cultivated agent of human granulocytic ehrlichiosis: promising activity of quinolones and rifamycins." *Antimicrob Agents Chemother* **41**(1): 76-9.
- Koehler, J. E., F. D. Quinn, et al. (1992). "Isolation of Rochalimaea species from cutaneous and osseous lesions of bacillary angiomatosis." *N Engl J Med* **327**(23): 1625-31.
- Koehler, J. E. and J. W. Tappero (1993). "Bacillary angiomatosis and bacillary peliosis in patients infected with human immunodeficiency virus." *Clin Infect Dis* **17**(4): 612-24.
- Koehler, J. E., C. A. Glaser, et al. (1994). "Rochalimaea henselae infection. A new zoonosis with the domestic cat as reservoir." *Jama* **271**(7): 531-5.
- Koehler, J. E. (1995). "Bartonella-associated infections in HIV-infected patients." *AIDS Clin Care* **7**(12): 97-102.
- Koehler, J. E., M. A. Sanchez, et al. (1997). "Molecular epidemiology of bartonella infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis." *N Engl J Med* **337**(26): 1876-83.
- Kohn, B., D. Galke, et al. (2008). "Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs." *J Vet Intern Med* **22**(6): 1289-95.
- Knowles, R. C., C. W. Anderson, et al. (1983). "Acute equine diarrhea syndrome (AEDS): a preliminary report." *Proc Am Assoc Equine Pract* **29**: 353-7.
- Kontos, V. I., O. Papadopoulos, et al. (1991). "Natural and experimental canine infections with a Greek strain of *Ehrlichia platys*." *Vet Clin Pathol* **20**(4): 101-105.
- Kontos, V. I. and L. V. Athanasiou, (1998). "Use of enrofloxacin in the treatment of acute canine ehrlichiosis." *Canine Practice* **23**: 10-4.
- Kordick, D., M. Lappin et al. (1995). Feline Rickettsial Diseases. *Kirk's Current Veterinary Therapy XII*. Edited by J. Bonagura; Philadelphia, W.B. Saunders. pp. 287-90
- Kordick, D. L., K. M. Wilson, et al. (1995b). "Prolonged Bartonella bacteremia in cats associated with cat-scratch disease patient." *J Clin Microbiol* **33**: 345-51.
- Kordick, D. L., B. Swaminathan, et al. (1996). "Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii subsp. nov., isolated from dogs; Bartonella vinsonii subsp. vinsonii; and emended description of Bartonella vinsonii." *Int J Syst Bacteriol* **46**(3): 704-9.
- Kordick, D. L., E. J. Hilyard, et al. (1997a). "Bartonella clarridgeiae, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat scratch disease)." *J Clin Microbiol* **35**(7): 1813-8.

- Kordick, D. L. and E. B. Breitschwerdt (1997b). "Relapsing bacteremia after blood transmission of *Bartonella henselae* to cats." *Am J Vet Res* **58**(5): 492-7.
- Kordick, D. L. and E. B. Breitschwerdt (1998). "Persistent infection of pets within a household with three *Bartonella* species." *Emerg Infect Dis* **4**(2): 325-8.
- Kordick, S. K., E. B. Breitschwerdt, et al. (1999). "Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound kennel in North Carolina." *J Clin Microbiol* **37**(8): 2631-8.
- Kordick, D. L., T. T. Brown, et al. (1999b). "Clinical and pathologic evaluation of chronic *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cats." *J Clin Microbiol* **37**(5): 1536-47.
- Kosoy, M. Y., R. L. Regnery, et al. (1997). "Distribution, diversity, and host specificity of *Bartonella* in rodents from the Southeastern United States." *Am J Trop Med Hyg* **57**(5): 578-88.
- Kosoy, M. Y., R. L. Regnery, et al. (1998). "Isolation of *Bartonella* spp. from embryos and neonates of naturally infected rodents." *J Wildl Dis* **34**(2): 305-9.
- Kosoy, M., M. Murray, et al. (2003). "Bartonella strains from ground squirrels are identical to *Bartonella washoensis* isolated from a human patient." *J Clin Microbiol* **41**(2): 645-50.
- Koutinas, A. F., V. Kontos, et al. (1995). "Canine leishmaniasis-associated nephropathy: a clinical, clinicopathologic and pathologic study in 14 spontaneous cases with proteinuria." *Eur J Comp Anim Pract* **2**: 31-8.
- Koutinas, A. F., Z. S. Polizopoulou, et al. (1999). "Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996)." *J Am Anim Hosp Assoc* **35**(5): 376-83.
- Kravetz, J. D. and D. G. Federman (2002). "Cat-associated zoonoses." *Arch Intern Med* **162**(17): 1945-52.
- Kuehn, N. F. and S. D. Gaunt (1985). "Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis." *J Am Vet Med Assoc* **186**(4): 355-8.
- Kwok, S. and R. Higuchi (1989). "Avoiding false positives with PCR." *Nature* **339**(6221): 237-8.
- La Scola, B. and D. Raoult (1999). "Culture of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* from human samples: a 5-year experience (1993 to 1998)." *J Clin Microbiol* **37**(6): 1899-905.
- La Scola, B., B. Davoust, et al. (2002). "Lack of correlation between *Bartonella* DNA detection within fleas, serological results, and results of blood culture in a *Bartonella*-infected stray cat population." *Clin Microbiol Infect* **8**(6): 345-51.
- Labro, M. T. and H. Abdelghaffar (2001). "Immunomodulation by macrolide antibiotics." *J Chemother* **13**(1): 3-8.
- Lachaud, L., S. Marchegui-Hammami, et al. (2002). "Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis." *J Clin Microbiol* **40**(1): 210-5.
- Lagardere, B., B. Chevallier, et al. (1992). "Le kala-azar." *Ann Pédiatr (Paris)* **39**(3): 159-64.
- Lainson, R., J. J. Shaw (1987). Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. W. Peters and R. Killick-Kendrick (eds). Academic Press, London, pp. 1-120.
- Lamothe, J. (1997). "An illustration of the unusual clinical conditions of canine leishmaniasis. *First World Congress on Leishmaniasis*." Istanbul. pp. 103.
- Lamothe, J. (1999). "Treatment of canine leishmaniasis from A (Amphotericin B) to Z (ZyloricR)." In: *Canine leishmaniasis: an update*. Barcelona, Proc. International Canine Leishmaniasis Forum. Hoechst Roussel Vet.
- Landau, M., Y. Kletter, et al. (1999). "Unusual eruption as a presenting symptom of cat scratch disease." *J Am Acad Dermatol* **41**(5 Pt 2): 833-6.
- Lang, S., R. W. Watkin, et al. (2004). "Detection of bacterial DNA in cardiac vegetations by PCR after the completion of antimicrobial treatment for endocarditis." *Clin Microbiol Infect* **10**(6): 579-81.
- Lanotte, G., J. A. Rioux, et al. (1974). "Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 7. Dépistage de l'enzoootie canine par les méthodes immunosérologiques." *Ann Parasitol Hum Comp* **49**(1): 41-62.
- Lappin, M. R. and J. C. Black (1999). "*Bartonella* spp infection as a possible cause of uveitis in a cat." *J Am Vet Med Assoc* **214**(8): 1205-7, 1200.
- Lappin, M. R., J. Brunt, et al. (2003a). "*Bartonella* spp. and *Mycoplasma haemominutum* DNA in blood of cats and their fleas." *Proceedings of the ACVIM Forum*, Charlotte, NC. p. 929.
- Lappin, M. R. (2003b). "What the clinician needs to know about vector borne diseases of cats." *North American Veterinary Conference (NAVC), Small Animal-Infectious Disease*, p. 491.
- Lappin, M. R., E. B. Breitschwerdt, et al. (2004). "Molecular and serologic evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in cats in North America." *J Am Vet Med Assoc* **225**(6): 893-6, 879.
- Lappin, M. R., B. Griffin, et al. (2006). "Prevalence of *Bartonella* species, *Haemoplasma* species, *Ehrlichia* species, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Neorickettsia risticii* DNA in the blood of cats and their fleas in the United States." *J Feline Med Surg* **8**(2): 85-90.
- Lappin, M. R. (2006b). "Canine and feline vector-borne diseases with special emphasis on *Bartonella* spp. and *Haemobartonella* spp.." *The International Canine Vector-Borne Disease Symposium (CVBD)*, Billesley, Alcester, UK.
- Larsen, C. E. and L. E. Patrick (1992). "Abdominal (liver, spleen) and bone manifestations of cat scratch disease." *Pediatr Radiol* **22**(5): 353-5.
- Laruelle-Magalon, C. and I. Toga, (1996). "Un cas de leishmaniose féline." *Prat Méd Chir Anim Comp* **31**: 255-61.

- Latifynia, A. and S. M. Hazrati (2008). "Safety and toxicity of a new formulated *Leishmania major* preliminary vaccine in animal model Balb/c and small white conventional laboratory mice." *Turkiye Parazitoloj Derg* **32**(2): 103-8.
- Lawson, P. A. and M. D. Collins (1996). "Description of *Bartonella clarridgeiae* sp nov isolated from the cat of a patient with *Bartonella henselae* septicemia." *Med Microbiol Lett* **5**: 64-73.
- le Fichoux, Y., J. F. Quaranta, et al. (1999). "Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France." *J Clin Microbiol* **37**(6): 1953-7.
- Leandro, C., G. M. Santos-Gomes, et al. (2001). "Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis." *Vet Immunol Immunopathol* **79**(3-4): 273-84.
- Leishman, W. B. (2006). "On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. 1903." *Indian J Med Res* **123**(3): 1252-4; discussion 79.
- Leiva, M., A. Lloret, et al. (2005). "Therapy of ocular and visceral leishmaniasis in a cat." *Vet Ophthalmol* **8**(1): 71-5.
- Lewis, G. E., Jr., D. L. Huxsoll, et al. (1975). "Experimentally induced infection of dogs, cats, and nonhuman primates with *Ehrlichia equi*, etiologic agent of equine ehrlichiosis." *Am J Vet Res* **36**(1): 85-8.
- Lewis, G. E., Jr., M. Ristic, et al. (1977). "The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*." *Am J Vet Res* **38**(12): 1953-5.
- Liao, H. M., F. Y. Huang, et al. (2006). "Systemic cat scratch disease." *J Formos Med Assoc* **105**(8): 674-9.
- Lillini, E., G. Macri, et al. (1996). "Ehrlichia seropositivity in italian foresters." *Rickettsiae and Rickettsial Diseases*. J. Kazar, Toman, R. Bratislava, Stara Lesna, Slovakia, Slovak Academy of Sciences: pp. 335-9.
- Lima, W. G., M. S. Michalick, et al. (2004). "Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes." *Acta Trop* **92**(1): 43-53.
- Longhofer, S. L. (1988). "Chemotherapy of rickettsial, protozoal, and chlamydial diseases." *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **18**(6): 1183-96.
- Longstaffe, J. A. and M. W. Guy (1986). "Canine leishmaniasis-United Kingdom update." *J Small Anim Pract* **27**(10): 663-71.
- Lopez, J., M. Rivera, et al. (2003). "[Serologic evidence for human Ehrlichiosis in Chile]." *Rev Med Chil* **131**(1): 67-70.
- Lucena, R., P. J. Ginel, et al. (1996). "Antinuclear antibodies in dogs with leishmaniasis." *Zentralbl Veterinarmed A* **43**(4): 255-9.
- Lucientes-Curdi, J., C., Sanchez-Acedo, et al. (1988). "Sobre la infección natural por *Leishmania* en *phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 y *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921, en el foco de leishmaniasis de Zaragoza." *Revista Ibérica Parasitológica* **48**: 7-8.
- Luria, B. J., J. K. Levy, et al. (2004). "Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida." *J Feline Med Surg* **6**(5): 287-96.
- Llanos, E. A., N. Roncal, et al. (1999). "Natural infections of *Leishmania peruviana* in animals in the Peruvian Andes." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **93**: 15-20.
- Maazoun, R., G. Lanotte, et al. (1981). "[Ecology of leishmaniasis in southern France. 16. Contribution to the chemotaxonomy of parasites of Mediterranean visceral leishmaniasis. Apropos of 55 strains isolated in the Cevennes, Cote d'Azur, Corsica and Tunisia]." *Ann Parasitol Hum Comp* **56**(2): 131-46.
- Machattie, C., E. A. Mills, et al. (1931). "Naturally occurring oriental sore of the domestic cat in Iraq." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **25**: 103-6.
- Madewell, B. R. and D. H. Gribble (1982). "Infection in two dogs with an agent resembling *Ehrlichia equi*." *J Am Vet Med Assoc* **180**(5): 512-4.
- Madigan, J. E., Y. Rikihisa, et al. (1995). "Evidence for a high rate of false-positive results with the indirect fluorescent antibody test for *Ehrlichia risticii* antibody in horses." *J Am Vet Med Assoc* **207**(11): 1448-53.
- Madigan, J. E., N. Pusterla, et al. (2000). "Transmission of *Ehrlichia risticii*, the agent of Potomac horse fever, using naturally infected aquatic insects and helminth vectors: preliminary report." *Equine Vet J* **32**(4): 275-9.
- Maeda, K., N. Markowitz, et al. (1987). "Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia." *N Engl J Med* **316**(14): 853-6.
- Maggi, R. G., A. W. Duncan, et al. (2005a). "Novel chemically modified liquid medium that will support the growth of seven bartonella species." *J Clin Microbiol* **43**(6): 2651-5.
- Maggi, R. G., C. A. Harms, et al. (2005b). "*Bartonella henselae* in porpoise blood." *Emerg Infect Dis* **11**(12): 1894-8.
- Maggi, R. G. and E. B. Breitschwerdt (2005c). "Potential limitations of the 16S-23S rRNA intergenic region for molecular detection of *Bartonella* species." *J Clin Microbiol* **43**(3): 1171-6.
- Magnarelli, L. A. and J. F. Anderson (1993). "Serologic evidence of canine and equine ehrlichiosis in northeastern United States." *J Clin Microbiol* **31**(11): 2857-60.
- Magnarelli, L. A., K. C. Stafford, 3rd, et al. (1995). "Hemocytic rickettsia-like organisms in ticks: serologic reactivity with antisera to *Ehrlichiae* and detection of DNA of agent of human granulocytic ehrlichiosis by PCR." *J Clin Microbiol* **33**(10): 2710-4.
- Magnarelli, L. A., S. L. Bushmich, et al. (2005). "Seroprevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in cats." *Am J Vet Res* **66**(11): 1895-9.
- Maguina, C. and E. Gotuzzo, (2000). "Emerging and re-emerging diseases in Latin America: bartonellosis, new and old." *Infect Dis Clin North Am* **14**: 1-22.

- Maia, C., M. Nunes, et al. (2008). "Importance of Cats in Zoonotic Leishmaniasis in Portugal." *Vector Borne Zoonotic Dis.*
- Maillard, R., P. Riegel, et al. (2004). "Bartonella chomelii sp. nov., isolated from French domestic cattle (*Bos taurus*)."
J Syst Evol Microbiol **54**(Pt 1): 215-20.
- Mancianti, F., L. Gradoni, et al. (1986). "Canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy." *Trop Med Parasitol* **37**(2): 110-2.
- Mancianti, F., M. Gramiccia, et al. (1988). "Studies on canine leishmaniasis control. I. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment". *Trans R Soc Trop Med Hyg* **82**: 566-567.
- Mancianti, F. and S. Sozzi (1995). "Isolation of Leishmania from a newborn puppy." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **89**(4): 402.
- Mancianti, F. (2004). "[Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat?]." *Parassitologia* **46**(1-2): 203-6.
- Mancieira, D. B., Rde. C. de Meneses, et al. (2008). "Prevalence and risk factors for hemoplasmas in domestic cats naturally infected with feline immunodeficiency virus and/or feline leukemia virus in Rio de Janeiro, Brazil." *J Feline Med Surg* **10**(2): 120-9.
- Mandle, T., H. Einsele, et al. (2005). "Infection of human CD34+ progenitor cells with Bartonella henselae results in intraerythrocytic presence of B. henselae." *Blood* **106**(4): 1215-22.
- Manfredi, M. T., V. Dini, et al. (1999). "Tick species parasitizing people in an area endemic for tick-borne diseases in north-western Italy." *Parassitologia* **41**(4): 555-60.
- Manfredi, R. and S. Sabbatani (2006). "Bartonellosis: suggestive case reports in adult and pediatric patients and therapeutic issues." *Braz J Infect Dis* **10**(6): 411-5.
- Mansueto, P., G. Di Lorenzo, et al. (2003). "[Bartonellosis]." *Recenti Prog Med* **94**(4): 177-85.
- Maretzki, C. H., D. J. Fisher, et al. (1994). "Granulocytic ehrlichiosis and meningitis in a dog." *J Am Vet Med Assoc* **205**(11): 1554-6.
- Margileth, A. M. (1988). "Dermatologic manifestations and update of cat scratch disease." *Pediatr Dermatol* **5**(1): 1-9.
- Margileth, A. M. (1993). "Cat scratch disease." *Adv Pediatr Infect Dis* **8**: 1-21.
- Maroli, M., M. G. Pennisi, et al. (2007). "Infection of sandflies by a cat naturally infected with Leishmania infantum." *Vet Parasitol* **145**(3-4): 357-60.
- Marquez, F. J., M. A. Muniain, et al. (2002). "Presence of Rickettsia felis in the cat flea from southwestern Europe." *Emerg Infect Dis* **8**(1): 89-91.
- Marston, E. L., B. Finkel, et al. (1999). "Prevalence of Bartonella henselae and Bartonella clarridgeiae in an urban Indonesian cat population." *Clin Diagn Lab Immunol* **6**(1): 41-4.
- Martin-Sanchez, J., J. A. Lepe, et al. (1999). "Leishmania (Leishmania) infantum enzymatic variants causing canine leishmaniasis in the Huelva province (south-west Spain)." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **93**(5): 495-6.
- Martin-Sanchez, J., C. Acedo, et al. (2007). "Infection by Leishmania infantum in cats: epidemiological study in Spain." *Vet Parasitol* **145**(3-4): 267-73.
- Martinez, J. and A. Lloret (1992). "Leishmaniosis canina: Un estudio retrospectivo." *Premios Fundación Purina*: pp. 71-88.
- Martinez, D., J. C. Maillard, et al. (1994). "Protection of goats against heartwater acquired by immunisation with inactivated elementary bodies of Cowdria ruminantium." *Vet Immunol Immunopathol* **41**(1-2): 153-63.
- Martinez-Moreno, A., M. S. Martinez-Cruz, et al. (1993). "Immunological and histological study of T- and B-lymphocyte activity in canine visceral leishmaniosis." *Vet Parasitol* **51**(1-2): 49-59.
- Martinez-Moreno, A., T. Moreno, et al. (1995). "Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis." *Vet Immunol Immunopathol* **48**(3-4): 209-20.
- Martinez-Orsio, H., M. Calonge, et al. (2005). "Cat-scratch disease (ocular bartonellosis) presenting as bilateral recurrent iridocyclitis." *Clin Infect Dis* **40**(5): e43-5.
- Marullo, S., A. Jaccard, et al. (1992). "Identification of the Rochalimaea henselae 16S rRNA sequence in the liver of a French patient with bacillary peliosis hepatis." *J Infect Dis* **166**(6): 1462.
- Maruyama, S., S. Nogami, et al. (1996). "Isolation of Bartonella henselae from domestic cats in Japan." *J Vet Med Sci* **58**(1): 81-3.
- Maruyama, S., H. Kabeya, et al. (2000a). "Three cases of cat scratch disease diagnosed by indirect immunofluorescence antibody assay and/or polymerase chain reaction of 16S rRNA gene of Bartonella henselae." *J Vet Med Sci* **62**(12): 1321-4.
- Maruyama, S., S. Boonmar, et al. (2000b). "Seroprevalence of Bartonella henselae and Toxoplasma gondii among healthy individuals in Thailand." *J Vet Med Sci* **62**(6): 635-7.
- Maruyama, S., Y. Nakamura, et al. (2000c). "Prevalence of Bartonella henselae, Bartonella clarridgeiae and the 16S rRNA gene types of Bartonella henselae among pet cats in Japan." *J Vet Med Sci* **62**(3): 273-9.
- Massei, F., F. Messina, et al. (2004). "High prevalence of antibodies to Bartonella henselae among Italian children without evidence of cat scratch disease." *Clin Infect Dis* **38**(1): 145-8.
- Mastrandrea, S., M. S. Mura, et al. (2006). "Two cases of human granulocytic ehrlichiosis in Sardinia, Italy confirmed by PCR." *Ann N Y Acad Sci* **1078**: 548-51.
- Mathew, J. S., S. A. Ewing, et al. (1997). "Characterization of a new isolate of Ehrlichia platys (Order Rickettsiales) using electron microscopy and polymerase chain reaction." *Vet Parasitol* **68**(1-2): 1-10.

- Matthewman, L. A., P. J. Kelly, et al. (1993). "Western blot and indirect fluorescent antibody testing for antibodies reactive with *Ehrlichia canis* in sera from apparently healthy dogs in Zimbabwe." *J S Afr Vet Assoc* **64**(3): 111-5.
- Matthewman, L. A., P. J. Kelly, et al. (1994). "Further evidence for the efficacy of imidocarb dipropionate in the treatment of *Ehrlichia canis* infection." *J S Afr Vet Assoc* **65**(3): 104-7.
- Matthewman, L. A., P. J. Kelly, et al. (1996). "Antibodies in cat sera from southern Africa react with antigens of *Ehrlichia canis*." *Vet Rec* **138**(15): 364-5.
- Mattot, M., J. Ninane, et al. (1992). "Visceral and cutaneous leishmaniasis in an european pediatric population." *Acta Clin Belg* **47**(4): 231-7.
- Maurin, M., R. Birtles, et al. (1997). "Current knowledge of *Bartonella* species." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **16**(7): 487-506.
- Mazza. Quoted by Bez, M. (1927). "La leishmaniose chez le chat- Enquete seroepidemiologique dans les Alpes-Maritimes. (Thèse Doct. Vet.)." Ecole Nationale Veterinaire de Lyon, n° 46.
- McBride, J. W., R. E. Corstvet, et al. (1996). "PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs." *J Vet Diagn Invest* **8**(4): 441-7.
- McConkey, S. E., A. Lopez, et al. (2002). "Leishmanial polyarthritis in a dog." *Can Vet J* **43**(8): 607-9.
- McGill, S.L., R. L. REgnery, et al. (1998). "Characterization of human immunoglobulin (Ig) isotype and IgG subclass response to *Bartonella henselae* infection." *Infect Immun* **66**(12): 5915-20.
- McQuiston, J. H., C. D. Paddock, et al. (1999). "The human ehrlichioses in the United States." *Emerg Infect Dis* **5**(5): 635-42.
- McQuiston, J. H., J. E. Childs, et al. (2000). "Transmission of tick-borne agents of disease by blood transfusion: a review of known and potential risks in the United States." *Transfusion* **40**(3): 274-84.
- Meana, A., C. Rupérez, et al. (1993). "Estudio epidemiológico de las parasitosis de perros abandonados en la provincia de Madrid. Datos preliminares I: Protozoosis." *Acta Parasitol Portuguesa* **1**(2): 212.
- Mehock, J. R., C. E. Greene, et al. (1998). "*Bartonella henselae* invasion of feline erythrocytes in vitro." *Infect Immun* **66**(7): 3462-6.
- Meinkoth, J. H., J. P. Hoover, et al. (1989). "Ehrlichiosis in a dog with seizures and nonregenerative anemia." *J Am Vet Med Assoc* **195**(12): 1754-5.
- Meinkoth, J. H., S. A. Ewing, et al. (1998). "Morphologic and molecular evidence of a dual species ehrlichial infection in a dog presenting with inflammatory central nervous system disease." *J Vet Intern Med* **12**(5): 389-93.
- Mello, G. B. (1940). "Verificação da infecção natural do gato (*Felis domesticus*) por um protozoário do genero *Leishmania*." *Brasil Méd* **54**: 180.
- Merchant, S. R. and J. Taboada (1995). "Systemic diseases with cutaneous manifestations." *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **25**(4): 945-59.
- Messick, J. B. and Y. Rikihisa (1993). "Characterization of *Ehrlichia risticii* binding, internalization, and proliferation in host cells by flow cytometry." *Infect Immun* **61**(9): 3803-10.
- Mexas, A. M., S. I. Hancock, et al. (2002). "*Bartonella henselae* and *Bartonella elizabethae* as potential canine pathogens." *J Clin Microbiol* **40**(12): 4670-4.
- Michalsky, E. M., M. F. Rocha, et al. (2007). "Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies." *Vet Parasitol* **147**(1-2): 67-76.
- Miranda, S., X. Roura, et al. (2005). "Clinically patent canine leishmaniosis shows age, breed and sex predilection." *Third World Congress on Leishmaniasis*, Sicily, Italy, p. 171.
- Miró, G., A. Montoya, et al. (2007). "A leishmaniosis surveillance system among stray dogs in the region of madrid: ten years of serodiagnosis (1996-2006)." *Parasitol Res* **101**:253-7.
- Misao, T. and Y. Kobayashi, (1955). "Studies on infectious mononucleosis (glandular fever). I. Isolation of the etiological agent from blood, bone marrow and lymph nodes of a patient infected with infectious mononucleosis by using mice." *Kyushu J Med Sci* **6**: 145-52.
- Mishra, M., U. K. Biswas, et al. (1992). "Amphotericin versus pentamidine in antimony-unresponsive kala-azar." *Lancet* **340**(8830): 1256-7.
- Misic-Majerus, L., N. Bujic, et al. (2006). "[Human anaplasmosis (ehrlichiosis)]." *Acta Med Croatica* **60**(5): 411-9.
- Molia, S., B. B. Chomel, et al. (2004). "Prevalence of *Bartonella* infection in wild African lions (*Panthera leo*) and cheetahs (*Acinonyx jubatus*)." *Vet Microbiol* **100**(1-2): 31-41.
- Molina, R., C. Amela, et al. (1994). "Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **88**(4): 491-3.
- Molina, R. (1995). "*Phlebotomus perniciosus*: aspectos entomológicos prácticos de la leishmaniosis canina." *Curso de Enfermedades Vectoriales*. Madrid. pp. 5-12.
- Mollaret, P., J. Reilly, et al. (1950). "[On a regional, subacute and spontaneously curable adenopathy with intradermal reaction and peculiar lymph node lesions.]" *Bull Mem Soc Med Hop Paris* **66**: 424-49.
- Molleda, J. M., M. Novales, et al. (1993). "Clinical and histopathological study of the eye in canine leishmaniasis." *Isr J Vet Med* **48**: 173-8.

- Monjour, L., C. Mille, et al. (1978). "Application de l'immuno-electro-diffusion, sur membrane d'acetate de cellulose, au diagnostic de la leishmaniose viscerale humaine et canine." *Ann Soc Belg Med Trop* **58**: 293-300.
- Montenegro, J. (1926). "A cutis-reacção na leishmaniose." *Ann Fac Med Sao Paulo* **1**: 323-33.
- Morais, J. D., J. E. Dawson, et al. (1991). "First European case of ehrlichiosis." *Lancet* **338**(8767): 633-4.
- Morillas, F., F. Sanchez Rabasco, et al. (1996). "Leishmaniosis in the focus of the Axarquia region, Malaga province, southern Spain: a survey of the human, dog, and vector." *Parasitol Res* **82**(6): 569-70.
- Morozova, O. V., F. C. Cabello, et al. (2004). "Semi-nested PCR detection of Bartonella henselae in Ixodes persulcatus ticks from Western Siberia, Russia." *Vector Borne Zoonotic Dis* **4**(4): 306-9.
- Morsy, T. A., S. A. Michael, et al. (1980). "Cats as reservoir host of human parasites in Amman, Jordan." *J Egypt Soc Parasitol* **10**: 5-18.
- Morsy, T. A. and S. M. Abou el Seoud (1994). "Natural infection in two pet cats in a house of a zoonotic cutaneous leishmaniasis patient in Imbaba area, Giza Governorate, Egypt." *J Egypt Soc Parasitol* **24**(1): 199-204.
- Morsy, T. A., M. A. Al-Dakhil, et al. (1999). "Natural Leishmania infection in sand cats captured in Riyadh district, Saudi Arabia." *J Egypt Soc Parasitol* **29**(1): 69-74.
- Moshkovski, S. D. (1945). "Cytotropic inducers of infection and the classification of the Rickettsiae with Clamidozoa." *Adv Mod Biol (Moscow)* **19**: 1-44.
- Moss, J. T. and J. P. Wilson (1992). "Current treatment recommendations for leishmaniasis." *Ann Pharmacother* **26**(11): 1452-5.
- Motoi, Y., H. Satoh, et al. (2001). "First detection of Ehrlichia platys in dogs and ticks in Okinawa, Japan." *Microbiol Immunol* **45**(1): 89-91.
- Mueller-Anneling, L., M. J. Gilchrist, et al. (2000). "Ehrlichia chaffeensis antibodies in white-tailed deer, Iowa, 1994 and 1996." *Emerg Infect Dis* **6**(4): 397-400.
- Murphy, G. L., S. A. Ewing, et al. (1998). "A molecular and serologic survey of Ehrlichia canis, E. chaffeensis, and E. ewingii in dogs and ticks from Oklahoma." *Vet Parasitol* **79**(4): 325-39.
- Murray, H. W., J. Hariprasad, et al. (1993). "Treatment of experimental visceral leishmaniasis in a T-cell-deficient host: response to amphotericin B and pentamidine." *Antimicrob Agents Chemother* **37**(7): 1504-5.
- Mylonakis, M. E., A. F. Koutinas, et al. (2003). "Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): a comparison between five methods." *Vet Microbiol* **91**(2-3): 197-204.
- Mylonakis, M. E., A. F. Koutinas, et al. (2004). "Chronic canine ehrlichiosis (Ehrlichia canis): a retrospective study of 19 natural cases." *J Am Anim Hosp Assoc* **40**(3): 174-84.
- Naber, C. K. and R. Erbel (2007). "Infective endocarditis with negative blood cultures." *Int J Antimicrob Agents* **30** Suppl 1: S32-6.
- Naranjo, C., D. Fondevila, et al. (2005). "Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis." *Vet Parasitol* **133**(1): 37-47.
- Nasirudeen, A. M. and M. L. Thong (1999). "Prevalence of Bartonella henselae immunoglobulin G antibodies in Singaporean cats." *Pediatr Infect Dis J* **18**(3): 276-8.
- Neal R.A., S. Allen, et al. (1995) The sensitivity of Leishmania species to aminosidine. *J Antimicrob Chemother* **35**:577-584.
- Neer, T. M. (1998). "Ehrlichiosis: canine monocytic and granulocytic ehrlichiosis." In: *Infectious Diseases of the dog and the cat*. 2nd edition. C. E. Greene. Philadelphia, WB Saunders Co: pp. 139-49.
- Neer, T. M., S. M. Eddlestone, et al. (1999). "Efficacy of enrofloxacin for the treatment of experimentally induced Ehrlichia canis infection." *J Vet Intern Med* **13**(5): 501-4.
- Neer, T. M., E. B. Breitschwerdt, et al. (2002). "Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. American College of Veterinary Internal Medicine." *J Vet Intern Med* **16**(3): 309-15.
- Neer, T. M. and S. Harrus (2006). "Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, Anaplasmosis, and Wolbachia Infection." In: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. C. E. Greene (ed.). Canada, Saunders Elsevier: 203-32.
- Neogy, A. B., I. Vouldoukis, et al. (1992). "Serodiagnosis and screening of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Corsica: applicability of a direct agglutination test and immunoblot analysis." *Am J Trop Med Hyg* **47**(6): 772-7.
- Newton, C. R. (1995). "Setting up a PCR laboratory." In: *PCR: Essential data*. C. R. Newton. Wiley, New York: p. 216.
- Nicholson, W. L., S. Muir, et al. (1998). "Serologic evidence of infection with Ehrlichia spp. in wild rodents (Muridae: Sigmodontinae) in the United States." *J Clin Microbiol* **36**(3): 695-700.
- Noah, D. L., C. M. Kramer, et al. (1997). "Survey of veterinary professionals and other veterinary conference attendees for antibodies to Bartonella henselae and B quintana." *J Am Vet Med Assoc* **210**(3): 342-4.
- Noli, C. and S. T. Auxilia (2005). "Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review." *Vet Dermatol* **16**: 213-32.
- Nowotny, N., A. Deutz, et al. (1997). "Prevalence of swine influenza and other viral, bacterial, and parasitic zoonoses in veterinarians." *J Infect Dis* **176**(5): 1414-5.

- Nutter, F. B., J. P. Dubey, et al. (2004). "Seroprevalences of antibodies against *Bartonella henselae* and *Toxoplasma gondii* and fecal shedding of *Cryptosporidium* spp, *Giardia* spp, and *Toxocara cati* in feral and pet domestic cats." *J Am Vet Med Assoc* **225**(9): 1394-8.
- Nyindo, M. B., M. Ristic, et al. (1971). "Tropical canine pancytopenia: in vitro cultivation of the causative agent--*Ehrlichia canis*." *Am J Vet Res* **32**(11): 1651-8.
- Nyindo, M., D. L. Huxsoll, et al. (1980). "Cell-mediated and humoral immune responses of German Shepherd Dogs and Beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*." *Am J Vet Res* **41**(2): 250-4.
- Nyindo, M., I. Kakoma, et al. (1991). "Antigenic analysis of four species of the genus *Ehrlichia* by use of protein immunoblot." *Am J Vet Res* **52**(8): 1225-30.
- O'Connor, T. P., J. L. Hanscom, et al. (2006). "Comparison of an indirect immunofluorescence assay, western blot analysis, and a commercially available ELISA for detection of *Ehrlichia canis* antibodies in canine sera." *Am J Vet Res* **67**: 206-10.
- Ogosuku, E., J. E. Perez, et al. (1994). "Identification of bloodmeal sources of *Lutzomya* spp. in Perú." *Ann Trop Med Parasit* **88**: 329-35.
- Ohashi, N., A. Unver, et al. (1998). "Cloning and characterization of multigenes encoding the immunodominant 30-kilodalton major outer membrane proteins of *Ehrlichia canis* and application of the recombinant protein for serodiagnosis." *J Clin Microbiol* **36**(9): 2671-80.
- OIE (2004). "Código sanitario para los animales terrestres." 13ª edición. París. 500 págs.
- Okada, H., H. Usuda, et al. (2003). "Distribution of ehrlichiae in tissues as determined by in-situ hybridization." *J Comp Pathol* **128**(2-3): 182-7.
- Oliva, G., A. Scalone, et al. (2006). "Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic and nested PCR techniques in a cohort of naïve dogs exposed to three consecutive transmission seasons." *J Clin Microbiol* **44**: 1318-22.
- Oliveira-Lima, J. W. (1996). "Transmission of cutaneous leishmaniasis in Brazil." Boston, USA, Harvard School of Public Health: 152.
- Olmeda, S., R. Martín, et al. (1993). "Estudio epidemiológico de las parasitosis de perros abandonados en la provincia de Madrid. Datos preliminares. III: Ectoparasitosis." *Acta Parasitológica Portuguesa* **1**: 218.
- OMS (1990). "Lucha contra las leishmaniasis." Series de Informes Técnicos de la OMS nº 793. OMS, Ginebra, 177 págs.
- OMS (2000). "Leishmania/HIV co.infection in south-western Europe 1990-1998: retrospective analysis of 965 cases." WHO/LEISH/2000.42. OMS, Ginebra, 12 págs.
- OMS, (2006). "Control de la leishmaniasis, Informe de la Secretaría." 118ª reunión. Punto S.1 del orden del día provisional. EB118/4.
- O'Reilly, K. L., R. W. Bauer, et al. (1999). "Acute clinical disease in cats following infection with a pathogenic strain of *Bartonella henselae* (LSU16)." *Infect Immun* **67**(6): 3066-72.
- Ortega, E., M. A. Escobar, et al. (2004). "Modification of phagocytosis and cytokine production in peritoneal and splenic murine cells by erythromycin A, azithromycin and josamycin." *J Antimicrob Chemother* **53**(2): 367-70.
- Ortuno, A., C. B. Gauss, et al. (2005). "Serological evidence of *Ehrlichia* spp. exposure in cats from northeastern Spain." *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **52**(5): 246-8.
- Oteo, J. A., J. R. Blanco, et al. (2000). "First report of human granulocytic ehrlichiosis from southern Europe (Spain)." *Emerg Infect Dis* **6**(4): 430-2.
- Oteo, J. A., H. Gil, et al. (2001). "Presence of granulocytic ehrlichia in ticks and serological evidence of human infection in La Rioja, Spain." *Epidemiol Infect* **127**(2): 353-8.
- Oteo, J. A. and V. Ibarra (2002). "[DEBONEL (Dermacentor-borne-necrosis-erythema lymphadenopathy). A new tick-borne disease?]." *Enferm Infecc Microbiol Clin* **20**(2): 51-2.
- Oteo, J. A., A. Castilla, et al. (2006). "[Endocarditis due to *Bartonella* spp. Three new clinical cases and Spanish literature review]." *Enferm Infecc Microbiol Clin* **24**(5): 297-301.
- Otranto, D. et al. (2007). "Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area." *Veterinary Parasitology* **144**: 270-78.
- Otranto, D., P. Paradies, et al. (2008). "Application of 10% imidacloprid/50% permethrin to prevent *Ehrlichia canis* exposure in dogs under natural conditions." *Vet Parasitol* **153**(3-4): 320-8.
- Ozon, C., P. Marty, et al. (1995). "Résultats d'une enquête sur la leishmaniose canine effectuée pendant une courte période chez les vétérinaires praticiens des Alpes-Maritimes." *Prat Méd Chir Anim Comp* **30**: 199-201.
- Ozon, C., P. Marty, et al. (1998). "Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Southern France." *Vet Parasitol* **75**(2-3): 273-7.
- Paddock, C. D., S. M. Folk, et al. (2001). "Infections with *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in persons coinfecting with human immunodeficiency virus." *Clin Infect Dis* **33**(9): 1586-94.
- Paddock, C. D., J. W. Sumner, et al. (1997). "Isolation and characterization of *Ehrlichia chaffeensis* strains from patients with fatal ehrlichiosis." *J Clin Microbiol* **35**(10): 2496-502.
- Palmer, J. E. (1989). "Prevention of Potomac horse fever." *Cornell Vet* **79**(3): 201-5.
- Pappalardo, B. L., M. T. Correa, et al. (1997). "Epidemiologic evaluation of the risk factors associated with exposure and seroreactivity to *Bartonella vinsonii* in dogs." *Am J Vet Res* **58**(5): 467-71.

- Parinaud, H. (1889). "Conjunctivite infectieuse transmise par les animaux." *Ann d'Oculistique* **101**: 252-3.
- Parola, P., L. Beati, et al. (1998). "Ehrlichial DNA amplified from *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in France." *J Med Entomol* **35**(2): 180-3.
- Parzy, D., B. Davoust, et al. (1991). "Human pathogenicity of *Ehrlichia canis*." *Lancet* **337**(8750): 1169.
- Pasquau, F., J. Ena, et al. (2005). "Leishmaniasis as an oportunistic infection in HIV-infected patients: determinants of relapse and mortality in a collaborative study of 228 episodies in a Mediterranean region." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **24**(6): 411-8.
- Passos, V. M., E. B. Lasmar, et al. (1996). "Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania* (*Viannia*) in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **91**(1): 19-20.
- Pearson, R. D. and A. Q. Sousa (1996). "Clinical spectrum of Leishmaniasis." *Clin Infect Dis* **22**(1): 1-13.
- Peavy, G. M., C. J. Holland, et al. (1997). "Suspected ehrlichial infection in five cats from a household." *J Am Vet Med Assoc* **210**(2): 231-4.
- Pena, M. T., X. Roura, et al. (2000). "Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998)." *Vet Ophthalmol* **3**(1): 35-41.
- Pennisi, M. G. (1999). "Case report of *Leishmania* spp. in two cats from Aeolian Archipelago (Italy)." *24th WSAVA Congress*, Lyon.
- Pennisi, M. G. (2002). "A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy." In: *Canine Leishmaniasis: Moving Towards a Solution*. R. Killick-Kendrick (ed.). Intervet International, Boxmeer: 39-48.
- Pennisi, M. G., M. Venza, et al. (2004). "Case report of leishmaniasis in four cats." *Vet Res Commun* **28 Suppl 1**: 363-6.
- Perez, M., Y. Rikihisa, et al. (1996). "Ehrlichia canis-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization." *J Clin Microbiol* **34**(9): 2133-9.
- Perez, M., M. Bodor, et al. (2006). "Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela." *Ann N Y Acad Sci* **1078**: 110-7.
- Perille, A. L. and R. E. Matus (1991). "Canine ehrlichiosis in six dogs with persistently increased antibody titers." *J Vet Intern Med* **5**(3): 195-8.
- Peris-Garcia, J., J. M. Cuadrado-Pastor, et al. (2007). "[Probable case of imported human anaplasmosis]." *Enferm Infecc Microbiol Clin* **25**(10): 656-7.
- Perry, B. D., E. T. Schmidtman, et al. (1989). "Epidemiology of Potomac horse fever: an investigation into the possible role of non-equine mammals." *Vet Rec* **125**(4): 83-6.
- Peters W, R Killick-Kendrick. (1987). The leishmaniasis in biology and medicine. Peters y R. Killick-Kendrick eds. (vol 1 y 2). Londres: Academic Press. pp. 291-363 (vol 1), pp. 847-907 (vol 2).
- Petrovec, M., S. Lotric Furlan, et al. (1997). "Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species." *J Clin Microbiol* **35**(6): 1556-9.
- Piarroux, R. (1996). "Résistance de *Leishmania infantum* au GlucantimeR: circonstances de survenue et prise en charge thérapeutique." *Arch Pédiatr* **3**: 352-6.
- Piarroux, R. (1997). "Diagnosis of visceral leishmaniasis using polymerase chain reaction: a five year experience of routine diagnosis in Marseilles." *First World Congress on Leishmaniasis*. p. 91, Istanbul.
- Pierard, D., E. Levchenko, et al. (1995). "Ehrlichiosis in Belgium." *Lancet* **346**(8984): 1233-4.
- Pierce, K. R., G. E. Marrs, et al. (1977). "Acute canine ehrlichiosis: platelet survival and factor 3 assay." *Am J Vet Res* **38**(11): 1821-5.
- Pinelli, E., R. Killick-Kendrick, et al. (1994). "Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*." *Infect Immun* **62**(1): 229-35.
- Pittalunga, G. (1912). "Hallazgo de *Leishmania infantum* (protozoo parásito del "kala-azar infantil") en la costa de Levante de España." *Bol Inst Nac Hig Alfonso XIII* **8**: 137-9.
- Pittalunga, G. (1913). "Leishmaniosis espontánea del perro en la comarca de Tortosa." *Bol Soc Esp Biol* **2**: 132-3.
- Poli, A., S. Sozzi, et al. (1997). "Comparison of aminosidine (paromomycin) and sodium stibogluconate for treatment of canine leishmaniasis." *Vet Parasitol* **71**(4): 263-71.
- Pons, I., I. Sanfeliu, et al. (2005). "Prevalence of *Bartonella henselae* in cats in Catalonia, Spain." *Am J Trop Med Hyg* **72**(4): 453-7.
- Pons, I., I. Sanfeliu, et al. (2008a). "Seroprevalence of *Bartonella* spp. infection in HIV patients in Catalonia, Spain." *BMC Infect Dis* **8**: 58.
- Pons, I., I. Sanfeliu, et al. (2008b). "Serological evidence of *Bartonella henselae* infection in healthy people in Catalonia, Spain." *Epidemiol Infect*: 1-5.
- Portillo, A., A. S. Santos, et al. (2004). "Detección de variantes no patógenas de *Anaplasma phagocytophilum* en *Ixodes ricinus* de la Península Ibérica." *Enferm Infecc Microbiol Clin* **22**: 151.
- Portus, M. (1997). "Diagnóstico de laboratorio de la leishmaniosis canina." *Canis et felis*. **29**: 45-51.
- Pratlong, F., M. Portus, et al. (1989). "[Simultaneous presence in dogs of 2 zymodemes of the *Leishmania infantum* complex]." *Ann Parasitol Hum Comp* **64**(4): 312-4.
- Pretorius, A. M., P. J. Kelly, et al. (1999). "Isolation of *Bartonella henselae* from a serologically negative cat in Bloemfontein, South Africa." *J S Afr Vet Assoc* **70**(4): 154-5.

- Preziosi, D. E. and L. A. Cohn, (2002). "The increasingly complicated story of Ehrlichia." Compend Cont Educ Pract Vet **24**: 277-91.
- Prieto, M. (1999). "Estudio sobre la incidencia de garrapatas y piroplasmosis durante 1998." 38º Congreso Nacional de AVEPA, Barcelona, Spain. p. 287.
- Pusterla, N., J. Huder, et al. (1997). "Granulocytic ehrlichiosis in two dogs in Switzerland." J Clin Microbiol **35**(9): 2307-9.
- Pusterla, N., U. Braun, et al. (2000). "[Ehrlichiosis in Switzerland--significance for veterinary medicine]." Schweiz Arch Tierheilkd **142**(7): 367-73.
- Pusterla, N., J. E. Madigan, et al. (2000b). "Helminthic transmission and isolation of *Ehrlichia risticii*, the causative agent of Potomac Horse Fever, by using trematode stages." J Clin Microbiol **38**(3): 1293-7.
- Pusterla, N., J. B. Pusterla, et al. (1998). "Seroprevalence of Ehrlichia canis and of canine granulocytic Ehrlichia infection in dogs in Switzerland." J Clin Microbiol **36**(12): 3460-2.
- Pyle, R. L. (1980). "Canine ehrlichiosis." J Am Vet Med Assoc **177**(12): 1197-9.
- Quiles, J., J. Garcí, et al. (1979). "Leishmaniasis. Un problema actual." Rev San Hig Púb **53**: 771-807.
- Quinnell, R. J., O. Courtenay, et al. (2001). "Detection of Leishmania infantum by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs." Parasitology **122**(Pt 3): 253-61.
- Quinnell, R. J., O. Courtenay, et al. (2003a). "IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis." Vet Immunol Immunopathol **91**(3-4): 161-8.
- Quinnell, R. J., L. J. Kennedy, et al. (2003b). "Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism." Immunogenetics **55**(1): 23-8.
- Ramírez, M. A. (2001). "Otras zoonosis transmitidas por garrapatas: babesiosis y ehrlichiosis. Lyme and related diseases". First tick-borne Diseases Conference, University of Hull, Scarborough, UK.
- Raoult, D., F. Roblot, et al. (2006). "First isolation of Bartonella alsatica from a valve of a patient with endocarditis." J Clin Microbiol **44**(1): 278-9.
- Rassam, M. B. and S. A. Al-Mudhaffar (1980). "Comparative diagnostic study of kala azar." Ann Trop Med Parasitol **74**(3): 283-7.
- Reardon, M. J. and K. R. Pierce (1981a). "Acute experimental canine ehrlichiosis. I. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems." Vet Pathol **18**(1): 48-61.
- Reardon, M. J. and K. R. Pierce (1981b). "Acute experimental canine ehrlichiosis. II. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular system of selectively immunosuppressed dogs." Vet Pathol **18**(3): 384-95.
- Reed, J. A., D. J. Brigati, et al. (1992). "Immunocytochemical identification of Rochalimaea henselae in bacillary (epithelioid) angiomatosis, parenchymal bacillary peliosis, and persistent fever with bacteremia." Am J Surg Pathol **16**(7): 650-7.
- Regnery, R. L., B. E. Anderson, et al. (1992a). "Characterization of a novel Rochalimaea species, R. henselae sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient." J Clin Microbiol **30**(2): 265-74.
- Regnery, R., M. Martin, et al. (1992b). "Naturally occurring 'Rochalimaea henselae' infection in domestic cat." Lancet **340**(8818): 557-8.
- Regnery, R. L., J. A. Rooney, et al. (1996). "Experimentally induced Bartonella henselae infections followed by challenge exposure and antimicrobial therapy in cats." Am J Vet Res **57**(12): 1714-9.
- Regnery, R., M. Marano, et al. (2000). "A fourth Bartonella species, Bartonella weissii, species nova, isolated from domestic cats (abstract)." Proceedings of the 15th Sesquiannual Meeting, Captiva Island, Florida, Am Soc Rickettsiol.
- Reine, N. J. (2004). "Infection and blood transfusion: a guide to donor screening". Clinical Techniques in Small Animal Practice **19**: 68-74.
- Reiter, I., A. Kretzschmar, et al. (1985). "Zur leishmaniose des hundes. Infektion von beagles mit Leishmania donovani." Berl Münch Tierärztl Wschr **98**: 40-4.
- Relman, D. A., J. S. Loutit, et al. (1990). "The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens." N Engl J Med **323**(23): 1573-80.
- Resto-Ruiz, S., A. Burgess, et al. (2003). "The role of the host immune response in pathogenesis of Bartonella henselae." DNA Cell Biol **22**(6): 431-40.
- Reubel, G. H., J. E. Barlough, et al. (1998a). "Production and characterization of Ehrlichia risticii, the agent of Potomac horse fever, from snails (Pleuroceridae: Juga spp.) in aquarium culture and genetic comparison to equine strains." J Clin Microbiol **36**(6): 1501-11.
- Reubel, G. H., R. B. Kimsey, et al. (1998b). "Experimental transmission of Ehrlichia equi to horses through naturally infected ticks (Ixodes pacificus) from Northern California." J Clin Microbiol **36**(7): 2131-4.
- Rhalem, A., H. Sahibi, et al. (1997). "Cell-mediated immune response in treated dogs with pentamidine drug against Leishmania infantum." First World Congress on Leishmaniasis. pp. 43, Istanbul.
- Riera, C., J. E. Valladares, et al. (1999). "Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with Leishmania infantum and treated with meglumine antimoniate." Vet Parasitol **84**(1-2): 33-47.
- Riera, C., R. Fisa, et al. (2008). "Asymptomatic infection by Leishmania infantum in blood donors from the Balearic Islands (Spain)." Transfusion **48**(7): 1383-9.

- Rikihisa, Y. (1991). "The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases." Clin Microbiol Rev **4**(3): 286-308.
- Rikihisa, Y., S. A. Ewing, et al. (1992). "Analyses of Ehrlichia canis and a canine granulocytic Ehrlichia infection." J Clin Microbiol **30**(1): 143-8.
- Rikihisa, Y., S. A. Ewing, et al. (1994). "Western immunoblot analysis of Ehrlichia chaffeensis, E. canis, or E. ewingii infections in dogs and humans." J Clin Microbiol **32**(9): 2107-12.
- Rioux JA, G. Lanotte, et al. (1971). Leishmaniose experimentale du renard *Vulpes vulpes* (L.). Rec Med Vet Eco D'Alfort. **147**: 489-498
- Rioux, J., A., Guilvard, et al. (1986). "Phlebotomus ariasi Tonnoir 1921 et Phlebotomus perniciosus Newstead 1911 vecteurs du complexe Leishmania infantum dans un meme foyer. Infestations par deux zymodemes syntopiques. A propos d'une enquete en Catalogne (Espagne)". In : Leishmania. Taxonomie et Phylogenese. Applications Éco-Épidémiologiques. Ed. IMEEE. pp. 439-444. Montpellier: IMEEE
- Rioux, J. A., G. Lanotte, et al. (1990). "Taxonomy of Leishmania. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification." Ann Parasitol Hum Comp **65**(3): 111-25.
- Ripoll, C. M., C. E. Remondegui, et al. (1999). "Evidence of rickettsial spotted fever and ehrlichial infections in a subtropical territory of Jujuy, Argentina." Am J Trop Med Hyg **61**(2): 350-4.
- Ristic, M., D. L. Huxsoll, et al. (1972). "Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence." Infect Immun **6**(3): 226-31.
- Ristic, M. (1976). "Tick-borne rickettsias of veterinary importance with emphasis on the immunology of the disease." In: Tick-borne Diseases and Their Vectors. J. K. H. Wilde. Edinburgh, Edinburgh University Press: pp. 475-81.
- Ristic, M., D. L. Huxsoll, et al. (1981). "Evidence of a serologic relationship between Ehrlichia canis and Rickettsia sennetsu." Am J Trop Med Hyg **30**(6): 1324-8.
- Ristic, M., C. J. Holland, et al. (1986). "Diagnosis of equine monocytic ehrlichiosis (Potomac horse fever) by indirect immunofluorescence." J Am Vet Med Assoc **189**(1): 39-46.
- Ristic, M., J. Dawson, et al. (1988). "Susceptibility of dogs to infection with Ehrlichia risticii, causative agent of equine monocytic ehrlichiosis (Potomac horse fever)." Am J Vet Res **49**(9): 1497-500.
- Ristic, M. and Holland, C. J. (1993). Canine ehrlichiosis. Woldehiwet, Ristic (ed.). Oxford, United Kingdom, Pergamon Press. pp. 169-186.
- Rodriguez, M., M. A. Tesouro, et al. (1984). "Leishmaniosis canina." Bol Inform Cons Gral Col Vet Esp **26**: 119-25.
- Rodríguez, M. T., M. A. Tesouro, et al. (1988). Leishmaniosis canina. XIII Congreso Anual de la WSAVA. pp. 262-6, Barcelona.
- Rodríguez, J. A. (1993). "Aspectos da luta contra os carrapatos em Espanha, com discriminação dos principais métodos, das respectivas drogas e sua eficácia. Proceedings II S.I.S.I.E.T. Evora, Portugal.
- Rodriguez-Cortes, A., A. Ojeda, et al. (2007). "A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis." Int J Parasitol **37**(6): 683-93.
- Rodriguez-Barradas, M. C., R. J. Hamill, et al. (1995). "Genomic fingerprinting of Bartonella species by repetitive element PCR for distinguishing species and isolates." J Clin Microbiol **33**(5): 1089-93.
- Rojas, T. and J. L. Avila (1987). "American Leishmania spp: formycin B treatment of cutaneous leishmaniasis in mice." Parasitology **94** (Pt 3): 467-74.
- Rolain, J. M., B. La Scola, et al. (2001). "Immunofluorescent detection of intraerythrocytic Bartonella henselae in naturally infected cats." J Clin Microbiol **39**(8): 2978-80.
- Rolain, J. M., C. Foucault, et al. (2002). "Bartonella quintana in human erythrocytes." Lancet **360**(9328): 226-8.
- Rolain, J. M., M. Franc, et al. (2003). "Molecular detection of Bartonella quintana, B. koehlerae, B. henselae, B. clarridgeiae, Rickettsia felis, and Wolbachia pipientis in cat fleas, France." Emerg Infect Dis **9**(3): 338-42.
- Rolain, J. M., C. Locatelli, et al. (2004). "Prevalence of Bartonella clarridgeiae and Bartonella henselae in domestic cats from France and detection of the organisms in erythrocytes by immunofluorescence." Clin Diagn Lab Immunol **11**(2): 423-5.
- Rondón, A. (2006). Leishmaniasis. Revisión. Cátedra de Dermatología. Escuela Vargas, Universidad Central de Venezuela (UCV).
- Rossi, E., G. Bongiorno, et al. (2008). "Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural Leishmania infection of Phlebotomus perniciosus (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy." Acta Trop **105**(2): 158-65.
- Rosychuck, R. A. W., White, S. D. (1991). "Systemic infectious diseases and infestations that cause cutaneous lesions." Vet Med **86**(2): 164-181.
- Rosypal, A. C., G. C. Troy, et al. (2005). "Transplacental transmission of a North American isolate of Leishmania infantum in an experimentally infected beagle." J Parasitol **91**(4): 970-2.
- Roura, X., A. Sánchez, et al. (1997). "Follow-up of Leishmania infected dogs after treatment using a PCR technique." First World Congress on Leishmaniasis. pp. 99, Istanbul.
- Roux, V. and D. Raoult (1999). "Body lice as tools for diagnosis and surveillance of reemerging diseases." J Clin Microbiol **37**(3): 596-9.

- Roy, A. F., R. E. Corstvet, et al. (2001). "Evaluation and use of a nested polymerase chain reaction assay in cats experimentally infected with *Bartonella henselae* genotype I and *Bartonella henselae* genotype II." *J Vet Diagn Invest* **13**(4): 312-22.
- Roze, M. (1986). "Manifestations oculaires de la leishmaniose canine." *Rec Méd Vét* **162**(1): 19-26.
- Roze, M. (1990). "Manifestations oculaires de la leishmaniose canine: étude sérologique." *Rec Méd Vét* **166**(1): 37-43.
- Roze, M. and J. P. Pagés (1994). "Autour de la leishmaniose." *Prat Méd Chir Anim Comp* **29**(1): 85-94.
- Rufenacht, S., H. Sager, et al. (2005). "Two cases of feline leishmaniasis in Switzerland." *Vet Rec* **156**(17): 542-5.
- Ruscio, M. and M. Cinco (2003). "Human granulocytic ehrlichiosis in Italy: first report on two confirmed cases." *Ann N Y Acad Sci* **990**: 350-2.
- Sainz, A., M. A. Tesouro, et al. (1995). "Seroprevalence of *Ehrlichia canis* infection in police dogs in Spain." *Preventive Vet Med* **23**: 179-82.
- Sainz, A., S. Delgado, et al. (1996a). "Seroprevalence of canine ehrlichiosis in Castilla-León (north-west Spain)." *Preventive Vet Med* **29**: 1-7.
- Sainz, A. (1996b). "Aspectos clínicos y epizootológicos de la ehrlichiosis canina. Estudio comparado de la eficacia terapéutica de la doxiciclina y el dipropionato de imidocarb (tesis doctoral)." Departamento de Patología Animal II. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
- Sainz, A., I. Amusatogui, et al. (1998). "Canine ehrlichiosis in the Comunidad de Madrid in central Spain." *Ann N Y Acad Sci* **849**: 438-40.
- Sainz, A., I. Amusatogui, et al. (1999). "*Ehrlichia platys* infection and disease in dogs in Spain." *J Vet Diagn Invest* **11**(4): 382-4.
- Sainz, A., C. H. Kim, et al. (2000a). "Serological evidence of exposure to *Ehrlichia* species in dogs in Spain." *Ann N Y Acad Sci* **916**: 635-42.
- Sainz, A., M. A. Tesouro, et al. (2000b). "Prospective comparative study of 3 treatment protocols using doxycycline or imidocarb dipropionate in dogs with naturally occurring ehrlichiosis." *J Vet Intern Med* **14**(2): 134-9.
- Sainz, A., I. Amusatogui, et al. (2000c). "Las ehrlichiosis en el perro: presente y futuro." *Profesión Veterinaria* **47**: 22-9.
- Sanchez, M. A., N. L. Diaz, et al. (2004). "Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*." *Am J Trop Med Hyg* **70**(6): 618-24.
- Sánchez-Botija, C. (1936). "Leishmaniosis canina." *Trabajos Inst Biol Anim* **4**: 70-87.
- Sanchis, R., C. Vitu, et al. (1976). "Les examens de laboratoire dans la leishmaniose canine." *Revue Méd Vét* **127**(8-9): 1191-202.
- Sander, A., C. Buhler, et al. (1997). "Detection and identification of two *Bartonella henselae* variants in domestic cats in Germany." *J Clin Microbiol* **35**(3): 584-7.
- Sander, A., M. Ruess, et al. (1998). "Two different genotypes of *Bartonella henselae* in children with cat-scratch disease and their pet cats." *Scand J Infect Dis* **30**(4): 387-91.
- Sander, A., R. Berner, et al. (2001). "Serodiagnosis of cat scratch disease: response to *Bartonella henselae* in children and a review of diagnostic methods." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **20**(6): 392-401.
- Sanfeliu, I., E. Anton, et al. (2008). "Description of *Bartonella* spp. infections in a General Hospital of Catalunya, Spain." *5th International Meeting on Rickettsiae and Rickettsial Diseases*, Marseille, France, ESCMID and ASR. p. 41.
- Sanogo, Y. O., B. Davoust, et al. (2003). "First evidence of *Anaplasma platys* in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodida) collected from dogs in Africa." *Onderstepoort J Vet Res* **70**(3): 205-12.
- Santos, A. S., F. Bacellar, et al. (2006). "Human exposure to *Anaplasma phagocytophilum* in Portugal." *Ann N Y Acad Sci* **1078**: 100-5.
- Savani, E. S., M. C. de Oliveira Camargo, et al. (2004). "The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, Sao Paulo State, Brazil." *Vet Parasitol* **120**(3): 229-33.
- Schaefer, J. J., J. Kahn, et al. (2008). "Antibiotic clearance of *Ehrlichia canis* from dogs infected by intravenous inoculation of carrier blood." *Ann N Y Acad Sci* **1149**: 263-9.
- Schmidt, D. A. and L. S. Roberts (1985). "Kinetoplastida: trypanosomes and their kin." En: *Foundations of Parasitology*. Schmidt and Roberts (eds.). Missouri, 63144, Times Mirror/Mosby College Publishing. pp. 26-83.
- Schouls, L. M., I. Van De Pol, et al. (1999). "Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks." *J Clin Microbiol* **37**(7): 2215-22.
- Schulein, R., A. Seubert, et al. (2001). "Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes. A unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*." *J Exp Med* **193**(9): 1077-86.
- Schwartzman, W. A. (1992). "Infections due to *Rochalimaea*: the expanding clinical spectrum." *Clin Infect Dis* **15**(6): 893-900.
- Seaman, R. L., S. A. Kania, et al. (2004). "Comparison of results for serologic testing and a polymerase chain reaction assay to determine the prevalence of stray dogs in eastern Tennessee seropositive to *Ehrlichia canis*." *Am J Vet Res* **65**(9): 1200-3.
- Segovia, M. and F.vMartin-Luengo (1985). "Leishmaniasis in the south-east of Spain preliminary results of a serological and epidemiological study in dogs." *Ann Trop Med Parasitol* **79**: 337-8.

- Seng, P., J. M. Rolain, et al. (2008). "Detection of Anaplasmataceae in digestive tract of south east asian fish." 5th International Meeting on Rickettsiae and Rickettsial Diseases, Marseille, France, ESCMID and ASR. p.56.
- Sergent E. D., S. E. Lombard et al. (1912). "La leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans le même habitation." Bulletin de la Société de Pathologie Exotique 5: 93-98.
- Shankarappa, B., S. K. Dutta, et al. (1992). "Antigenic and genomic relatedness among Ehrlichia risticii, Ehrlichia sensu, and Ehrlichia canis." Int J Syst Bacteriol 42(1): 127-32.
- Shaw, S., M. Kenny, et al. (2001a). "Canine granulocytic ehrlichiosis in the UK." Vet Rec 148(23): 727-8.
- Shaw, S. E., M. J. Day, et al. (2001b). "Tick-borne infectious diseases of dogs." Trends Parasitol 17(2): 74-80.
- Shaw, S. E., R. J. Birtles, et al. (2001c). "Arthropod-transmitted infectious diseases of cats." J Feline Med Surg 3(4): 193-209.
- Shaw, S. E., S. H. Binns, et al. (2005). "Molecular evidence of tick-transmitted infections in dogs and cats in the United Kingdom." Vet Rec 157(21): 645-8.
- Simoes-Mattos, L., M. R. Mattos, et al. (2005). "The susceptibility of domestic cats (Felis catus) to experimental infection with Leishmania braziliensis." Vet Parasitol 127(3-4): 199-208.
- Simpson, R. M., S. D. Gaunt, et al. (1991). "Evaluation of Rhipicephalus sanguineus as a potential biologic vector of Ehrlichia platys." Am J Vet Res 52(9): 1537-41.
- Slappendel, R. J. (1988). "Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands." Vet Q 10(1): 1-16.
- Slater, L. N., D. F. Welch, et al. (1990). "A newly recognized fastidious gram-negative pathogen as a cause of fever and bacteremia." N Engl J Med 323(23): 1587-93.
- Smith, R. D., M. Ristic, et al. (1975). "Platelet kinetics in canine ehrlichiosis: evidence for increased platelet destruction as the cause of thrombocytopenia." Infect Immun 11(6): 1216-21.
- Smith, R. D., D. M. Sells, et al. (1976). "Development of Ehrlichia canis, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick Rhipicephalus sanguineus and its differentiation from a symbiotic Rickettsia." Am J Vet Res 37(2): 119-26.
- Smith, B. E., M. B. Tompkins, et al. (2004). "Antinuclear antibodies can be detected in dog sera reactive to Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii, Ehrlichia canis, or Leishmania infantum antigens." J Vet Intern Med 18(1): 47-51.
- Solano-Gallego, L., J. Llull, et al. (2000). "The Iberian hound presents a predominantly cellular immune response against natural Leishmania infection." Vet Parasitol 90(1-2): 37-45.
- Solano-Gallego, L., P. Morell, et al. (2001a). "Prevalence of Leishmania infantum infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology." J Clin Microbiol 39(2): 560-3.
- Solano-Gallego, L., J. Llull, et al. (2001b). "Evaluation of the efficacy of two leishmanins in asymptomatic dogs." Vet Parasitol 102(1-2): 163-6.
- Solano-Gallego, L., C. Riera, et al. (2001c). "Leishmania infantum-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment." Vet Parasitol 96(4): 265-76.
- Solano-Gallego, L., H. Fernandez-Bellon, et al. (2003). "Cutaneous leishmaniasis in three horses in Spain." Equine Vet J 35(3): 320-3.
- Solano-Gallego, L., J. Bradley, et al. (2004). "Bartonella henselae IgG antibodies are prevalent in dogs from southeastern USA." Vet Res 35(5): 585-95.
- Solano-Gallego, L., J. Llull, et al. (2005). "Longitudinal study of dogs living in an area of Spain highly endemic for leishmaniasis by serologic analysis and the leishmanin skin test." Am J Trop Med Hyg 72(6): 815-8.
- Solano-Gallego, L., J. Llull, et al. (2006a). "A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain." Vet Res 37(2): 231-44.
- Solano-Gallego, L., B. Hegarty, et al. (2006b). "Serological and molecular evidence of exposure to arthropod-borne organisms in cats from northeastern Spain." Vet Microbiol 118(3-4): 274-7.
- Solano-Gallego, L., A. Rodriguez-Cortes, et al. (2007). "Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean." Am J Trop Med Hyg 76(4): 676-80.
- Solbach, W. and T. Laskay (2000). "The host response to Leishmania infection." Adv Immunol 74: 275-317.
- Sorenson, J. L. and G. V. Ling (1993). "Diagnosis, prevention, and treatment of urate urolithiasis in Dalmatians." J Am Vet Med Assoc 203(6): 863-9.
- Soto, J., B. A. Arana, et al. (2004). "Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis." Clin Infect Dis 38(9): 1266-72.
- Spach, D. H., W. C. Liles, et al. (1993). "Tick-borne diseases in the United States." N Engl J Med 329(13): 936-47.
- Sparagano, O. A., A. P. de Vos, et al. (2003). "Molecular detection of Anaplasma platys in dogs using polymerase chain reaction and reverse line blot hybridization." J Vet Diagn Invest 15(6): 527-34.
- SPSS (2007). SPSS Statistics 17.0 Command Syntax Reference. SPSS Inc.
- Stanczak, J. and A. Grzeszczuk (2006). "Seroprevalence of Anaplasma phagocytophilum among forestry rangers in northern and northeastern Poland." Ann N Y Acad Sci 1078: 89-91.
- Steuber, S., A. Moritz, et al. (1997). "The PCR: diagnostic tool for the pre and post treatment detection of L. infantum in dogs." First World Congress on Leishmaniasis. pp. 98, Istanbul.
- Stockham, S. L., D. A. Schmidt, et al. (1992). "Evaluation of granulocytic ehrlichiosis in dogs of Missouri, including serologic status to Ehrlichia canis, Ehrlichia equi and Borrelia burgdorferi." Am J Vet Res 53(1): 63-8.

- Strasek Smrdel, K., M. Petrovec, et al. (2008). Molecular characterization of *Anaplasma phagocytophilum* in dogs, Slovenia. 5th International Meeting on Rickettsiae and Rickettsial Diseases, Marseille, France, ESCMID and ASR, p. 46.
- Strauss-Ayali, D., G. Baneth, et al. (2007). "Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis." Vet Res **38**(4): 547-64.
- Stubbs, C. J., M. R. Lappin, et al. (1998). "Feline Ehrlichiosis." ACVIM (abstracts), p.230.
- Stubbs, C. J., C. J. Holland, et al. (2000). "Feline ehrlichiosis." Compend Cont Educ Pract Vet **22**: 307-17.
- Stuen, S., I. Van De Pol, et al. (2002). "Identification of *Anaplasma phagocytophilum* (formerly *Ehrlichia phagocytophila*) variants in blood from sheep in Norway." J Clin Microbiol **40**(9): 3192-7.
- Suksawat, J., C. Pitulle, et al. (2001a). "Coinfection with three *Ehrlichia* species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure." J Clin Microbiol **39**(1): 90-3.
- Suksawat, J., Y. Xuejie, et al. (2001b). "Serologic and molecular evidence of coinfection with multiple vector-borne pathogens in dogs from Thailand." J Vet Intern Med **15**(5): 453-62.
- Sumption, K. J., D. J. Wright, et al. (1995). "Human ehrlichiosis in the UK." Lancet **346**(8988): 1487-8.
- Symmers, W. S. (1960). "Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain." Lancet **1**(7116): 127-32.
- Szelc-Kelly, C. M., S. Goral, et al. (1995). "Serologic responses to Bartonella and Afipia antigens in patients with cat scratch disease." Pediatrics **96**(6): 1137-42.
- Tabar, M. D., L. Altet, et al. (2008). "Vector-borne infections in cats: Molecular study in Barcelona area (Spain)." Vet Parasitol **151**(2-4): 332-6.
- Tapp, R. A., A. F. Roy, et al. (2001). "Differential detection of Bartonella species and strains in cat scratch disease diagnostics by polymerase chain reaction amplification of 16S ribosomal RNA gene." J Vet Diagn Invest **13**(3): 219-29.
- Tarello, W. (2002a). "Granulocytic Ehrlichia-like bodies in a cat with chronic oral disease: case report." Revue Méd Vét **153**: 401-6.
- Tarello, W. (2002b). "Cutaneous lesions in dogs with *Dirofilaria (Nochtiella) repens* infestation and concurrent tick-borne transmitted diseases." Vet Dermatol **13**(5): 267-74.
- Tarello, W. (2005). "Microscopic and clinical evidence for *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum* infection in Italian cats." Vet Rec **156**(24): 772-4.
- Tassi, P. (1989). "Leishmaniosi canina. Terapia." SCIVAC: 73-9.
- Tassi, P., P. Ormas, et al. (1994). "Pharmacokinetics of N-methylglucamine antimoniate after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in the dog." Res Vet Sci **56**(2): 144-50.
- Terry, L. L., J. L. Lewis, Jr., et al. (1950). "Laboratory infection with *Leishmania donovani*; a case report." Am J Trop Med Hyg **30**(5): 643-9.
- Tesouro, M. A. (1984a). "Aspectos clínicos y laboratoriales del diagnóstico de la leishmaniosis canina. Estudio epizootológico en la provincia de Madrid (tesis doctoral)." Departamento de Patología General y Médica, Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.
- Tesouro, M. A., F. Jiménez, et al. (1984b). "Leishmaniosis canina: diagnóstico." Revista AVEPA **4**(13): 47-53.
- Tesouro, M. A., F. Jiménez, et al. (1989). "Evolución del número de casos de leishmaniosis canina en Madrid y otras provincias. Años 1981-1988." Vet Record (Ed. Española) **2**(1): 6-7.
- Tesouro, M. A., C. Fragío, et al. (1991). "Epizootological aspects of canine leishmaniasis in Spain." XXIV Congreso Mundial de Veterinaria, pp. 318, Río de Janeiro.
- Tesouro, M. A., F. Rodríguez, et al. (1992a). "Contribuciones al diagnóstico y patocronia de la leishmaniosis canina I." Información Veterinaria **125**: 40-6.
- Tesouro, M. A., F. Rodríguez, et al. (1992b). "Contribuciones al diagnóstico y patocronia de la leishmaniosis canina II." Información Veterinaria **127**: 34-40.
- Tesouro, M. A., A. Sainz, et al. (1993). "Concurrencia de ehrlichiosis canina con otras enfermedades hemáticas." II SISIET, Evora, Portugal.
- Tesouro, M. A., I. Amusatégui, et al. (1995a). "Tratamientos actuales." En: Tratamiento de la leishmaniosis canina. Encuesta epizootológica en la Comunidad Autónoma de Madrid. Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid. pp. 7-54.
- Tesouro, M. A., Sainz, A. (1995b). "Ehrlichiosis canina. Casos clínicos. Concurrencia con otros procesos." Curso de Enfermedades Vectoriales: 49-54.
- Tesouro, M. A., and Sainz, A. (2001). "Profilaxis. Ehrlichiosis canina en España." Canis et Felis **51**: 65-71.
- Thomaz-Soccol, V., G. Lanotte, et al. (1993a). "Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903." Ann Parasitol Hum Comp **68**(2): 107-8.
- Thomaz-Soccol, V., G. Lanotte, et al. (1993b). "Phylogenetic taxonomy of New World *Leishmania*." Ann Parasitol Hum Comp **68**(2): 104-6.
- Trapp, S. M., A. S. Dagnone, et al. (2006). "Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population." Vet Parasitol **140**(3-4): 223-30.

- Troy, G. C., J. C. Vulganot, et al. (1980). "Canine ehrlichiosis: a retrospective study of 30 naturally occurring cases." J Am Anim Hosp Assoc **16**: 181-7.
- Troy, G. C. and S. D. Forrester, (1990). "Ehrlichia canis, E. equi and E. risticii infections." Infectious Diseases of the Dog and Cat. C. E. Greene (ed.). Philadelphia, W. B. Saunders: pp. 404-14.
- Tsukahara, M., H. Tsuneoka, et al. (1998). "Bartonella henselae infection from a dog." Lancet **352**(9141): 1682.
- Ueno, H., Y. Muramatsu, et al. (1995). "Seroepidemiological survey of Bartonella (Rochalimaea) henselae in domestic cats in Japan." Microbiol Immunol **39**(5): 339-41.
- Ueno, H., Y. Hohdatsu, et al. (1996). "Does coinfection of B. henselae and FIV induce clinical disorders in cats?." Microbiol Immunol **40**: 617-620.
- Unver, A., Y. Rikihisa, et al. (1999). "Western and dot blotting analyses of Ehrlichia chaffeensis indirect fluorescent-antibody assay-positive and -negative human sera by using native and recombinant E. chaffeensis and E. canis antigens." J Clin Microbiol **37**(12): 3888-95.
- Unver, A., Y. Rikihisa, et al. (2003). "Analysis of 16S rRNA gene sequences of Ehrlichia canis, Anaplasma platys, and Wolbachia species from canine blood in Japan." Ann N Y Acad Sci **990**: 692-8.
- Valcárcel, Y., R. Bastero, et al. (2008). "[The epidemiology of hospital admissions due to leishmaniasis in Spain (1999-2003)]." Enferm Infecc Microbiol Clin **26**(5): 278-81.
- Van der Veer-Meerkerk, M. and H. C. van Zaanen (2008). "Visceral involvement in an immunocompetent male: a rare presentation of cat scratch disease." Neth J Med **66**(4): 160-2.
- Varela, F. (1992). "Inmunopatología de la leishmaniosis canina: bases teóricas y aspectos prácticos." Premios Fundación Purina: 11-54.
- Varela, F., X. Font, et al. (1997). "Thrombocytopenia and light-chain proteinuria in a dog naturally infected with Ehrlichia canis." J Vet Intern Med **11**(5): 309-11.
- Vayssier-Taussat, M. (2008). "Bartonella and host specificity." 5th International Meeting on Rickettsiae and Rickettsial Diseases, Marseille, France, ESCMID and ASR. p. 20.
- Vemulapalli, R., B. Biswas, et al. (1998). "Cloning and molecular analysis of genes encoding two immunodominant antigens of Ehrlichia risticii." Microb Pathol **24**(6): 361-72.
- Vidor, E. (1991). "Le chancre d'inoculation dans la leishmaniose canine à Leishmania infantum." Prat méd chir Anim Compagnie **26**: 133-7.
- Villemin P., M. Dubor, et al. (1984). Imidocarb activity against different protozoosis and rickettsiosis on dog and cat. Rev Med Vet (Toulouse) **135**: 441-448.
- Vinson, J. W., G. Varela, et al. (1969). "Trench fever. 3. Induction of clinical disease in volunteers inoculated with Rickettsia quintana propagated on blood agar." Am J Trop Med Hyg **18**(5): 713-22.
- Vinuelas, J., M. Garcia-Alonso, et al. (2001). "Meningeal leishmaniosis induced by Leishmania infantum in naturally infected dogs." Vet Parasitol **101**(1): 23-7.
- Vita, S., D. Santori, et al. (2005). "Feline leishmaniasis and ehrlichiosis: serological investigation in Abruzzo region." Vet Res Commun **29 Suppl 2**: 319-21.
- Vitu C., S., R. and A. Giauffret (1973). "Evolution des protéines sériques dans la leishmaniose canine." Compt Rend Sci Soc Biol **167**: 513-8.
- Waddle, J. R. and M. P. Littman (1988). "A retrospective study of 27 cases of naturally occurring canine ehrlichiosis." J Am Anim Hosp Assoc **24**: 615-20.
- Walker, D. H. and J. S. Dumler (1996). "Emergence of the ehrlichioses as human health problems." Emerg Infect Dis **2**(1): 18-29.
- Walker, D. H. and J. S. Dumler (1997). "Human monocytic and granulocytic ehrlichioses. Discovery and diagnosis of emerging tick-borne infections and the critical role of the pathologist." Arch Pathol Lab Med **121**(8): 785-91.
- Walton, B. C., J. J. Shaw, et al. (1977). "Observations on the in vitro cultivation of Leishmania braziliensis." J Parasitol **63**(6): 1118-9.
- Walls, J. J., B. Greig, et al. (1997). "Natural infection of small mammal species in Minnesota with the agent of human granulocytic ehrlichiosis." J Clin Microbiol **35**(4): 853-5.
- Walls, T., K. Moshal, et al. (2006). "Broad-range polymerase chain reaction for the diagnosis of Bartonella henselae endocarditis." J Paediatr Child Health **42**(7-8): 469-71.
- Waner, T., S. Harrus, et al. (1995). "Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis." Vet Immunol Immunopathol **48**(1-2): 177-82.
- Waner, T., M. Rosner, et al. (1996). "Detection of ehrlichial antigen in plasma of beagle dogs with experimental acute Ehrlichia canis infection." Vet Parasitol **63**(3-4): 331-5.
- Waner, T., S. Harrus, et al. (1997). "Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs." Vet Parasitol **69**(3-4): 307-17.
- Waner, T., C. Strenger, et al. (2000). "Comparison of a clinic-based ELISA test kit with the immunofluorescence test for the assay of Ehrlichia canis antibodies in dogs." J Vet Diagn Invest **12**(3): 240-4.
- Waner, T., S. Harrus, et al. (2001). "Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by Ehrlichia canis." Vet Parasitol **95**(1): 1-15.

- Waner, T., C. Strenger, et al. (2001b). "Kinetics of serologic cross-reactions between *Ehrlichia canis* and the *Ehrlichia* phagocytophila genogroups in experimental *E. canis* infection in dogs." *Vet Immunol Immunopathol* **66**: 237-43.
- Wear, D. J., A. M. Margileth, et al. (1983). "Cat scratch disease: a bacterial infection." *Science* **221**(4618): 1403-5.
- Weiser, M. G., M. A. Thrall, et al. (1991). "Granular lymphocytosis and hiperproteinemia in dogs with chronic ehrlichiosis." *J Am Anim Hosp Assoc* **27**: 84-8.
- Weisiger, R. M., M. Ristic, et al. (1974). "Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* assayed by the indirect fluorescent antibody method." *Am J Vet Res* **36**(5): 689-94.
- Weisiger, R. M., M. Ristic, et al. (1975). "Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* assayed by the indirect fluorescent antibody method." *Am J Vet Res* **36**(5): 689-94.
- Weiss, E. and G. A. Dasch (1981). "The Family Rickettsiae: pathogens of domestic animals and invertebrates: non pathogenic arthropod symbiotes." In: *The Procarities*. Berlin, Springer-Verlag: pp. 2161-71.
- Welch, D. F., D. A. Pickett, et al. (1992). "Rochalimaea henselae sp. nov., a cause of septicemia, bacillary angiomatosis, and parenchymal bacillary peliosis." *J Clin Microbiol* **30**(2): 275-80.
- Welch, D. F., D. M. Hensel, et al. (1993). "Bacteremia due to Rochalimaea henselae in a child: practical identification of isolates in the clinical laboratory." *J Clin Microbiol* **31**(9): 2381-6.
- Wen, B., Y. Rikihisa, et al. (1997). "Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline." *J Clin Microbiol* **35**(7): 1852-5.
- WHO (1984). "The Leishmaniasis." Technical Report Series N°. 701. Geneva, World Health Organization.
- WHO (1990). "Control of Leishmaniasis." Technical Report Series N°. 793, Geneva, World Health Organization.
- WHO (2004). "Division of control of tropical disease." Available online: <http://www.who.int/emc/diseases/leish/leisgeo1.html>.
- Wiebe, V. and P. Hamilton (2002). "Fluoroquinolone-induced retinal degeneration in cats." *J Am Vet Med Assoc* **221**(11): 1568-71.
- Williams, P. M., T. Giles, et al. (1998). Development and application of real-time quantitative PCR. In: *Gene Quantification*. F. Ferré (ed.), Birkhauser, Boston: pp. 313-25.
- Wolf, L., T. McPherson, et al. (2000). "Prevalence of *Ehrlichia ewingii* in Amblyomma americanum in North Carolina." *J Clin Microbiol* **38**(7): 2795.
- Woody, B. J. and J. D. Hoskins (1991). "Ehrlichial diseases of dogs." *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **21**(1): 75-98.
- Yabsley, M. J., A. S. Varela, et al. (2002). "Ehrlichia ewingii infection in white-tailed deer (Odocoileus virginianus)." *Emerg Infect Dis* **8**(7): 668-71.
- Yabsley, M. J., J. McKibben, et al. (2008). "Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii berkhoffii*, and *Rickettsia* spp. in dogs from Grenada." *Vet Parasitol* **151**(2-4): 279-85.
- Yamamoto, K., B. B. Chomel, et al. (2002). "Experimental infection of domestic cats with *Bartonella koehlerae* and comparison of protein and DNA profiles with those of other *Bartonella* species infecting felines." *J Clin Microbiol* **40**(2): 466-74.
- Yamamoto, K., B. B. Chomel, et al. (2003). "Infection and re-infection of domestic cats with various *Bartonella* species or types: *B. henselae* type I is protective against heterologous challenge with *B. henselae* type II." *Vet Microbiol* **92**(1-2): 73-86.
- Yeh, M. T., T. N. Mather, et al. (1997). "Serologic and molecular detection of granulocytic ehrlichiosis in Rhode Island." *J Clin Microbiol* **35**(4): 944-7.
- Yu, X. J., J. W. McBride, et al. (2000). "Molecular cloning and characterization of the 120-kilodalton protein gene of *Ehrlichia canis* and application of the recombinant 120-kilodalton protein for serodiagnosis of canine ehrlichiosis." *J Clin Microbiol* **38**(1): 369-74.
- Yu, D. H., Y. H. Li, et al. (2008). "Ehrlichia chaffeensis infection in dogs in South Korea." *Vector Borne Zoonotic Dis* **8**(3): 355-8.
- Zandvliet, M. M., E. Teske, et al. (2004). "[Ehrlichia and Babesia infections in dogs in The Netherlands]." *Tijdschr Diergeneeskde* **129**(22): 740-5.
- Zangwill, K. M., D. H. Hamilton, et al. (1993). "Cat scratch disease in Connecticut. Epidemiology, risk factors, and evaluation of a new diagnostic test." *N Engl J Med* **329**(1): 8-13.
- Zbinden, R., M. Hochli, et al. (1995). "Intracellular location of *Bartonella henselae* cocultivated with Vero cells and used for an indirect fluorescent-antibody test." *Clin Diagn Lab Immunol* **2**(6): 693-5.
- Zeaiter, Z., P. E. Fournier, et al. (2002). "Genomic variation of *Bartonella henselae* strains detected in lymph nodes of patients with cat scratch disease." *J Clin Microbiol* **40**(3): 1023-30.
- Zhang, X. F., J. Z. Zhang, et al. (2003). "Experimental *Ehrlichia chaffeensis* infection in beagles." *J Med Microbiol* **52**(Pt 11): 1021-6.
- Zhang, L., Y. Liu, et al. (2008). "Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China." *JAMA* **300**(19): 2263-70.
- Zuckerman, A. and R. Lainson (1977). "Leishmania." En: *Parasitic Protozoa*. I. Kreier (ed.). Academic Press, Inc, 10003. NY. pp. 57-133.

Zwolinski, J., J. Chmielewska-Badora, et al. (2004). "[Prevalence of antibodies to *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in forestry workers from the Lublin region]." Wiad Parazytol **50**(2): 221-7.

